

Aus dem Institut für Physiologie, Leiter: Herr Prof. Dr. med. Andreas Deußen
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden

**Untersuchungen zur ACE-Hemmung
von tryptophan- und tyrosinhaltigen Peptidmischen sowie
zur biotechnologischen Herstellung von Isoleucin-Tryptophan**

D i s s e r t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden

von

Master of Science Lydia Michelke
aus Potsdam

Dresden 2018

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Deußen

Institut für Physiologie

Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Georg Breier

Bereich Medizinische Biologie

Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2018

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. med. Richard H. W. Funk

Institut für Anatomie

Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus,
Technische Universität Dresden

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Blutdruck, kardiovaskuläre Krankheiten	1
1.2 Regulation des Blutdrucks	2
1.2.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	3
1.2.2 ACE	6
1.2.3 Kallikrein-Kinin-System	9
1.3 Behandlung von Bluthochdruck.....	10
1.3.1 Synthetische ACE-Inhibitoren.....	11
1.4 Bioaktive Peptide.....	14
1.4.1 Allgemein	14
1.4.2 ACE-hemmende Peptide.....	14
1.4.3 Isoleucin-Tryptophan.....	16
1.5 Herstellung von Dipeptiden	18
1.5.1 Chemische Synthese	18
1.5.2 Fermentation/Reifungsprozess.....	20
1.5.3 Enzymatische Hydrolyse	21
1.5.4 Rekombinante Proteine.....	21
1.5.4.1 Proteinexpression in <i>E. coli</i> und <i>K. lactis</i>	24
1.6 Zielstellung.....	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Material.....	26
2.1.1 Chemikalien	26
2.1.2 Enzyme	28
2.1.3 Standards.....	29
2.1.4 Kits.....	29
2.1.5 Mikroorganismen.....	30
2.1.6 Plasmide	30
2.1.7 Expressionsvektoren	30
2.1.8 Oligonukleotide	30
2.1.9 Antikörper.....	31
2.1.10 Tiere.....	31
2.1.11 hergestellte Puffer, Medien und Lösungen	31
2.1.12 Säulen für Proteinreinigung und Analyse.....	35
2.1.13 Software und Online-Werkzeuge.....	35
2.1.14 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	36
2.2 Molekularbiologische Methoden	37
2.2.1 Repetitive IW-Sequenz synthetisieren.....	37
2.2.2 Design von Oligonukleotid-Primern	37
2.2.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten	37
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	38
2.2.6 Plasmid-Vervielfältigung	39
2.2.6.1 Transformation	39
2.2.6.2 Plasmidaufreinigung und Kontrollverdau.....	39
2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	40
2.3.1 Proteinbestimmung	40

2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung.....	41
2.3.3	Western Blot.....	41
2.4	Klonierung in <i>E. coli</i>.....	42
2.4.1	Verdau von Plasmid-DNA und Vektor mit Restriktionsenzymen und Aufreinigung	42
2.4.2	Ligation der DNA.....	42
2.4.3	Transformation in <i>E. coli</i>	43
2.4.4	Detektion positiver Klone.....	43
2.5	Kultivierung und Expression mit <i>E. coli</i>	45
2.5.1	Lagerung der positiven Klone	45
2.5.2	Optimierung der Proteinproduktion des löslichen MBP-IW mit dem Klon pMALIW K18	45
2.5.3	Proteinproduktion mit dem Klon pMALIW K18.....	46
2.6	Proteinreinigung von MBP-IW aus <i>E. coli</i> und Isolation vom rekombinanten IW.....	46
2.6.1	Proteinreinigung	46
2.6.1.1	Zellaufschluss.....	46
2.6.1.2	Reinigung über Affinitätschromatographie	47
2.6.1.3	Reinigung über Größenausschlusschromatographie	48
2.6.2	Hydrolyse von MBP-IW und Isolation des rekombinanten IW	48
2.6.2.1	Konzentrierung	48
2.6.2.2	Hydrolyse von MBP-IW.....	49
2.6.2.3	Isolation vom rekombinanten IW über Größenausschlusschromatographie	49
2.6.2.4	Reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC).....	50
2.7	Analytik von rIW	51
2.7.1	RP-HPLC	51
2.7.2	Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).....	51
2.7.3	Identifizierung der N-terminalen Aminosäure im Dipeptid	51
2.8	Klonierung in <i>K. lactis</i>.....	52
2.8.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten und Aufreinigung	52
2.8.2	Verdau von Plasmid-DNA und PCR-Fragment mit Restriktionsenzymen und Aufreinigung	53
2.8.3	Ligation der DNA.....	54
2.8.4	Transformation	54
2.8.5	Detektion positiver Klone.....	54
2.8.6	Linearisierung von pKLAC2-MBPIW K10 sowie pKLAC1-malE und Integration in <i>K. lactis</i>	55
2.8.7	Identifizierung der Klone, deren Expressionskassette in das Genom von <i>K. lactis</i> integriert wurde	56
2.8.8	Genomische DNA isolieren und sequenzieren	57
2.9	Kultivierung und Expression mit <i>K. lactis</i>	59
2.9.1	Lagerung der positiven Klone	59
2.9.2	Optimierung der Proteinproduktion mit dem Klon pKLAC2- MBPIW K10 Klon 8.....	59
2.9.3	Methanol-Chloroform-Fällung	60
2.9.4	Proteinproduktion mit dem Klon pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8	60
2.10	Proteinreinigung von MBP-IW aus <i>K. lactis</i>.....	60
2.10.1	Reinigung über Affinitätschromatographie	60

2.10.2	Parameterprüfung	61
2.11	Bestimmung des ACE-hemmenden Potentials (ACE-Assay)	62
2.11.1	Herstellung der Peptidmische	62
2.11.2	Prinzip der Bestimmung des ACE-hemmenden Potentials	62
2.11.3	Hemmpotential von rIW und den Peptidmischen an ACE aus der Kaninchenlunge	63
2.11.4	Hemmpotential von rIW und den Peptidmischen an ACE aus humanem Plasma	64
2.11.5	Hemmpotential von rIW und den Peptidmischen an ACE aus Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)	65
2.11.6	Hemmpotential von den Peptidmischen an ACE aus Aortenringen von Ratten	66
2.11.7	Bestimmung der ACE-Aktivität mit RP-HPLC	67
2.12	Statistische Auswertung	68
3	Ergebnisse	69
3.1	Molekularbiologische Methoden	69
3.1.1	Plasmid-Vervielfältigung	69
3.2	Klonierung in <i>E. coli</i>	70
3.2.1	Verdau von Plasmid-DNA und Vektor mit Restriktionsenzymen und Aufreinigung	70
3.2.2	Detektion positiver Klone	70
3.3	Kultivierung und Expression mit <i>E. coli</i>	72
3.3.1	Optimierung der Proteinexpression des löslichen MBP-IW	72
3.4	Proteinreinigung von MBP-IW aus <i>E. coli</i> und Isolation von rIW	74
3.4.1	Proteinreinigung	74
3.4.1.1	Reinigung über Affinitätschromatographie	74
3.4.1.2	Reinigung über Größenausschlusschromatographie	77
3.4.2	Hydrolyse von MBP-IW und Isolation von rIW	79
3.4.2.1	Beurteilung der Hydrolyse	79
3.4.2.2	Isolation von rIW über Größenausschlusschromatographie	79
3.4.3	Ausbeuteberechnung	81
3.5	Analytik von rIW	83
3.5.1	RP-HPLC	83
3.5.2	LC-ESI-MS/MS	84
3.5.3	Identifizierung der N-terminalen Aminosäure im Dipeptid	86
3.6	Klonierung in <i>K. lactis</i>	87
3.6.1	PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten und Aufreinigung	87
3.6.2	Verdau von Plasmid-DNA sowie PCR-Fragment mit Restriktionsenzymen und Aufreinigung	87
3.6.3	Detektion positiver Klone	87
3.6.4	Linearisierung und Integration in <i>K. lactis</i>	88
3.6.5	Identifizierung der Klone, deren Expressionskassette richtig in das Genom von <i>K. lactis</i> integriert wurde	88
3.6.6	Isolation von genomischer DNA und Sequenzierung	90
3.7	Kultivierung und Expression mit <i>K. lactis</i>	91
3.7.1	Optimierung der Proteinexpression	91
3.8	Proteinreinigung von MBP-IW aus <i>K. lactis</i>	92
3.8.1	Reinigung über Affinitätschromatographie	92

3.8.2	Parameterprüfung	94
3.9	Bestimmung des ACE-hemmenden Potentials von rIW.....	96
3.9.1	Hemmpotential an ACE aus der Kaninchenlunge	96
3.9.2	Hemmpotential an ACE aus humanem Plasma	96
3.9.3	Hemmpotential an ACE aus HUVECs	97
3.10	Bestimmung des ACE-hemmenden Potentials der Peptidmixe	98
3.10.1	Hemmpotential der Peptidmixe an ACE aus der Kaninchenlunge	98
3.10.2	Hemmpotential der Peptidmixe an ACE aus humanem Plasma	99
3.10.3	Hemmpotential der Peptidmixe an ACE aus HUVECs.....	100
3.10.4	Hemmpotential der Peptidmixe an ACE aus der Rattenaorta	101
4	Diskussion.....	102
4.1	Produktion vom rekombinanten IW.....	102
4.2	ACE-hemmender Effekt.....	107
4.2.1	Rekombinantes IW	107
4.2.2	Peptidmixe	109
5	Zusammenfassung	113
6	Summary	116
7	Literaturverzeichnis.....	118
8	Anhang	i
8.1	Material und Methoden.....	i
8.1.1	Vektorkarten.....	i
8.1.2	Isolierung des IW-Konstrukts von MBP durch Faktor Xa	ii
8.1.3	Pufferzusammensetzung der SDS-Gele für die SDS-PAGE	iii
8.2	Ergebnisse	iv
8.2.1	Isolierung des IW-Konstrukts von MBP durch Faktor Xa	iv
8.2.2	Proteinreinigung von MBP-IW aus K. lactis - Parameterprüfung.....	v

Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>angiotensin-converting enzyme</i>
ACE2	<i>angiotensin-converting enzyme 2</i>
Ak	Antikörper
<i>amdS</i>	<i>acetamidase</i>
Amp	Ampicillin
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
Ang ₁₋₇	Angiotensin 1-7
Ang ₁₋₉	Angiotensin 1-9
AS	Aminosäure
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor
AT ₂ -Rezeptor	Angiotensin II Typ 2 Rezeptor
AU	<i>arbitrary unit</i>
B ₁ -Rezeptor	Bradykinin Rezeptor 1
B ₂ -Rezeptor	Bradykinin Rezeptor 2
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
°C	Grad Celsius
CAP	Captopril
cDIW	chemisch produziertes kommerziell erwerbliches D-IW
cIW	chemisch produziertes kommerziell erwerbliches L-IW
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
d’NTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

E-P-V	Enzym-Protein-Verhältnis
ESH/ESC	<i>European Society of Hypertension/European Society of Cardiology</i>
et al.	<i>et alii</i> (lat.), und andere
F	<i>forward</i> , vorwärts
FDA	<i>food and drug administration</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
h	Stunde(n)
Hip-HL	Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
HYD	Molkenproteinhydrolysat
IC ₅₀	Inhibitor-Konzentration, um die Enzymaktivität zu 50 % zu hemmen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JNC 7	<i>Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure</i>
Kan	Kanamycin
k _{cat}	katalytische Konstante
kDa	kilo Dalton
KG	Körpergewicht
KKS	Kallikrein-Kinin-System
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
LC-ESI-MS/MS	<i>liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry</i>
MBP	<i>Maltose Binding Protein</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute(n)
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
m/z	Masse/Ladung
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

NCL	<i>native chemical ligation</i>
NO	Stickstoffmonoxid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PSS	<i>physiological saline solution</i> , physiologische Salzlösung
R	<i>reverse</i> , rückwärts
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rIW	rekombinant produziertes IW
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RP-HPLC	<i>reversed phase-high performance liquid chromatography</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHR	spontan hypertensive Ratten
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
SV	Säulenvolumen
Ta	<i>Annealing</i> -Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV/Vis	ultraviolett/ <i>visible</i> , sichtbar
Wprot	<i>intact whey protein</i> , intaktes Molkenprotein

Tabelle I: Übersicht über die proteinogenen Aminosäuren und deren Abkürzungen

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
unbekannte Aminosäure	Xaa	X

1 Einleitung

1.1 Blutdruck, kardiovaskuläre Krankheiten

Nach wie vor zählen Herz-Kreislauf-Erkrankungen zur Todesursache Nummer 1 (Doulas et al., 2014). In diesem Zusammenhang spielt der Bluthochdruck eine wichtige Rolle, da es sich um einen der wichtigsten Risikofaktoren für koronare Herzerkrankungen, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz und Schlaganfall handelt (Zaman et al., 2002; Borghi & Rossi, 2015). Die Entwicklung von Bluthochdruck ist multifaktoriell und schließt Faktoren wie z.B. die genetische Prädisposition, Umwelt- oder Lebensstilfaktoren wie Rauchen, Stress, Gewicht, Bewegungsmangel, Alkoholkonsum usw. mit ein (Moinuddin et al., 2016). Laut den aktuellen Leitlinien der *European Society of Hypertension* und der *European Society of Cardiology* (ESH/ESC) wird ab einem Blutdruckwert von systolisch 140 mm Hg und diastolisch 90 mm Hg von Bluthochdruck gesprochen. Dieser wird zudem noch in drei verschiedene Stadien unterteilt (Stadium 1: 140-159/90-99 mm Hg, Stadium 2: 160-179/100-109 mm Hg und Stadium 3: $\geq 180/\geq 110$ mm Hg) (Tabelle 1.1, Mancia et al., 2013). Unbehandelter Bluthochdruck kann zu einer chronischen Schädigung des Gefäßsystems führen und trägt so z.B. zur Entstehung von Atherosklerose, Myokardinfarkten, Schlaganfall oder chronischen Nierenerkrankungen bei (Majumder et al., 2013; Majumder & Wu, 2015). Hierbei gilt, je höher der Blutdruck ist, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit, eine Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Nierenerkrankung zu bekommen (Chobanian et al., 2003). Außerdem ist bekannt, dass die linksventrikuläre Hypertrophie eine bedeutende Form der Endorganschädigung ist, welche durch Bluthochdruck verursacht wird (Stabouli et al., 2009).

Dauerhafte Blutdruckwerte im Hochnormalen-Bereich von systolisch 130-139 mm Hg und diastolisch 85-89 mm Hg werden laut *Joint National Committee (The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7))* bereits als prähypertensiv eingestuft (Chobanian et al., 2003). Prähypertonie wird nicht als behandlungswürdige Krankheit eingestuft, aber das Risiko, später Bluthochdruck des Stadiums 1, 2 oder 3 zu entwickeln, ist erhöht. Aus diesem Grund wird Prähypertonikern zunächst eine Lebensstiländerung empfohlen und im besten Fall werden die Patienten engmaschig beobachtet, aber vorerst nicht pharmakologisch behandelt (Chobanian et al., 2003; Moinuddin et al., 2016). Wenn die Patienten jedoch eine weitere Erkrankung haben (Diabetes mellitus Typ 2 oder Nierenerkrankung) oder es einen Nachweis für eine bereits vorhandene Herz-Kreislauf-Erkrankung gibt, werden hier

Ausnahmen gemacht (Fuchs, 2010; Collier & Landram, 2012) und es sollten blutdrucksenkende Medikamente verordnet werden.

Anders sieht das hingegen bei Patienten mit dem Hypertonie Stadium 1, 2 bzw. 3 aus (Tabelle 1.1). Hier wird, unabhängig davon, ob weitere Erkrankungen vorliegen oder nicht, eine Behandlung mit den Ziel-Blutdruckwerten von < 140/90 mm Hg nahe gelegt (Mancia et al., 2013).

Tabelle 1.1: Klassifikation des Blutdrucks nach den ESH/ESC-Leitlinien (modifiziert nach Mancia et al., 2013)

Klassifikation des Blutdrucks	systolischer Blutdruck (mm Hg)	diastolischer Blutdruck (mm Hg)
Optimal	< 120	< 80
Normal	120-129	80-84
Hochnormal	130-139	85-89
Hypertonie Stadium 1	140-159	90-99
Hypertonie Stadium 2	160-179	100-109
Hypertonie Stadium 3	≥ 180	≥ 110

1.2 Regulation des Blutdrucks

Der Blutdruck wird von verschiedensten Mechanismen reguliert. Kurzfristig kommt es durch Signale der Pressorezeptoren (Barorezeptoren, befindlich im Karotissinus und Aortenbogen), Dehnungsrezeptoren im Vorhof, arteriellen Chemorezeptoren oder der Ischämiereaktion des zentralen Nervensystems, welche über das sympathische und parasympathische Nervensystem wirken, zu einer Einstellung des Blutdrucks. Der wichtigste Mechanismus zur kurzfristigen Kontrolle des arteriellen Blutdrucks ist der Pressorezeptorenreflex. Bei einer Blutdrucksteigerung wird das sympathische Nervensystem reflektorisch gehemmt und der Parasympathikus aktiviert, wodurch der Blutdruck innerhalb von Sekunden normalisiert werden kann. Mittelfristig bis langfristig greifen verschiedene Hormone und humorale Systeme wie z.B. das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und das Kallikrein-Kinin-System (KKS) in die Regulierung des Blutdrucks ein. Die längerfristige Regulation des Blutdrucks basiert vor allem auf einer Anpassung des Blutvolumens und des Salzhaushalts. Hierbei spielt die Niere und deren Kontrolle der renalen Flüssigkeits- und Salzausscheidung eine entscheidende Rolle. Bei einer Erhöhung des Blutdrucks wird die renale Flüssigkeits- und Salzausscheidung erhöht. Dies führt wiederum zu einer Verringerung des Blutvolumens und einer damit verbundenen Abnahme des Herzzeitvolumens, wodurch es zu einer Verminderung des arteriellen

Blutdrucks kommt. Bei einer Verringerung des arteriellen Blutdrucks sind diese Mechanismen umgekehrt, was dementsprechend zu einer Erhöhung des arteriellen Blutdrucks führt (Guyton et al., 1972; Busse, 2007).

Im Weiteren wird näher auf die Bedeutung der humoralen Systeme RAAS und KKS sowie deren Beteiligung an der Regulation des Blutdrucks eingegangen.

1.2.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Ein wichtiger Regulator des Blutdrucks ist das RAAS, welches in Abbildung 1.1 dargestellt ist. Das Enzym Renin wird in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere gebildet. Renin spaltet aus dem in der Leber gebildeten Angiotensinogen das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) ab. Ang I kann anschließend von dem *angiotensin-converting enzyme* (ACE) zu dem biologisch aktiven Oktapeptid Angiotensin II (Ang II) umgewandelt werden (Zaman et al., 2002; Majumder & Wu, 2015). Das gebildete Ang II bindet selektiv an die transmembrane gebundenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (AT₁-Rezeptor) und Angiotensin II Typ 2 Rezeptor (AT₂-Rezeptor). Bei einer Bindung an den AT₁-Rezeptor vermittelt Ang II eine Vasokonstriktion der Gefäße, führt zur Freisetzung von Aldosteron, was zu einer Erhöhung der Wasser- und Salzretention in der Niere führt und aktiviert den Sympathikus durch Rezeptoren im Gehirn. Zusammenfassend führen diese verschiedenen Prozesse, ausgelöst durch die Bindung von Ang II an den AT₁-Rezeptor, zu einer Erhöhung des Blutdrucks (Zaman et al., 2002; Bader & Ganten, 2008; Majumder & Wu, 2015). Abgesehen von den Effekten auf den Blutdruck trägt Ang II auch zur Schädigung von Blutgefäßen bei. So werden beispielsweise die Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidasen aktiviert, was zur Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und somit des oxidativen Potentials in den Gefäßwänden führt (Zaman et al., 2002; Bader, 2010). Ein bereits beschriebener möglicher Mechanismus zur Aktivierung von NADPH-Oxidasen ist, dass die Untereinheit Rac-1 durch eine Ang II vermittelte Bindung an den AT₁-Rezeptor hochreguliert wird (Welch, 2008). Generell sind ROS unter anderem bei der Verdickung von Gefäßen und Entstehung von Entzündungen durch eine Inaktivierung von Stickstoffmonoxid (NO) involviert. Eine erhöhte Expression von ROS und eine geringe Bildung von NO sind Kennzeichen einer endothelialen Dysfunktion, welche oftmals begleitend auftritt oder sogar zur Entstehung von Bluthochdruck beiträgt (Bader, 2010).

Hingegen hat die Bindung von Ang II an den AT₂-Rezeptor in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen einen vasodilatatorischen Effekt. Es wird in Folge dieser Rezeptoraktivierung vermehrt NO freigesetzt und das Zellwachstum verhindert. Somit

vermittelt dieser Rezeptor bei Aktivierung eine protektive Wirkung gegen Bluthochdruck (Majumder & Wu, 2015).

Zur Verteilung der Rezeptoren ist bekannt, dass der AT₁-Rezeptor weit verbreitet in Geweben ist, welche hauptsächlich für die Aufrechterhaltung des Blutdrucks sowie für die Elektrolyt- und Flüssigkeitshomöostase verantwortlich sind (z.B. im Gefäßsystem, Herz oder Nierenrinde). Aber auch in anderen Geweben wie der Leber, dem Gehirn oder den Eierstöcken ist der AT₁-Rezeptor vorhanden. Der AT₂-Rezeptor zeigt eine weit verbreitete und hohe Expression in fetalen Geweben, jedoch ist dieser auch in adulten Geweben wie den Nebennieren, Gehirn, der Haut oder im vaskulären Gewebe vorhanden (Miyazaki et al., 1996; Al-Gburi et al., 2017).

Neben den bereits beschriebenen Komponenten des klassischen RAAS sind in den letzten Jahren noch weitere Komponenten entdeckt worden, welche ebenfalls in das System eingreifen (Abbildung 1.1). Es wurde eine ACE-verwandte Carboxypeptidase (*angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2)) beschrieben, welche als erstes menschliches Homolog zu ACE gilt (Donoghue et al., 2000). ACE2 kann Ang II zu Angiotensin 1-7 (Ang₁₋₇) hydrolisieren. Ang₁₋₇ bindet an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Mas und führt im Gegensatz zur AT₁-Rezeptor vermittelten Vasokonstriktion zu einer Vasodilatation, Freisetzung von NO und Reduktion von ROS (Santos et al., 2003; Santos & Ferreira, 2007; Bader, 2010). Zusammenfassend ist das ACE2-Ang₁₋₇-Mas System in der Lage, dem klassischen RAAS entgegenzuwirken (Bader, 2010). Außerdem kann ACE2 eine Aminosäure von Ang I abspalten und somit Angiotensin 1-9 (Ang₁₋₉) produzieren (Donoghue et al., 2000). Ang₁₋₉ scheint ebenfalls einen kardioprotektiven Effekt, durch die Bindung an den AT₂-Rezeptor, zu haben (Flores-Munoz et al., 2012; Mendoza-Torres et al., 2015). Weiterhin ist bekannt, dass Ang II auch von anderen Enzymen gebildet werden kann. So stellt die Serin Protease Chymase einen alternativen Weg zur Umwandlung von Ang I zu Ang II durch ACE dar. Die Chymase wird von den Mastzellen gebildet, welche innerhalb des Interstitiums zu finden sind (Zaman et al., 2002; Froogh et al., 2017). Wahrscheinlich ist das Enzym an der Bildung von Ang II in bestimmten Organen beteiligt, wobei der Chymase eine zentrale Rolle bei der Bildung von Ang II im Herzen zugewiesen wird (Urata et al., 1990; Froogh et al., 2017). Generell ist jedoch zu sagen, obwohl hier ACE-unabhängig Ang II gebildet werden kann, dass die Chymase vermutlich nicht an der kurzfristigen Regulierung des Blutdrucks beteiligt zu sein scheint. Auch die physiologische Rolle, die Chymase im Gefäßsystem spielt, ist nicht vollständig geklärt. Doch pathophysiologisch scheint es möglich, dass das Enzym besonders bei Gefäßerkrankungen und Gefäßverletzungen eine Rolle spielt, da hier die Anzahl der Mastzellen steigt und diese auch aktiviert werden können (Miyazaki & Takai, 2001; Doggrell

& Wanstall, 2004). Die Abbildung 1.1 stellt die Verknüpfung des klassischen RAAS (in schwarz) und der weiteren Komponenten (in blau) dar.

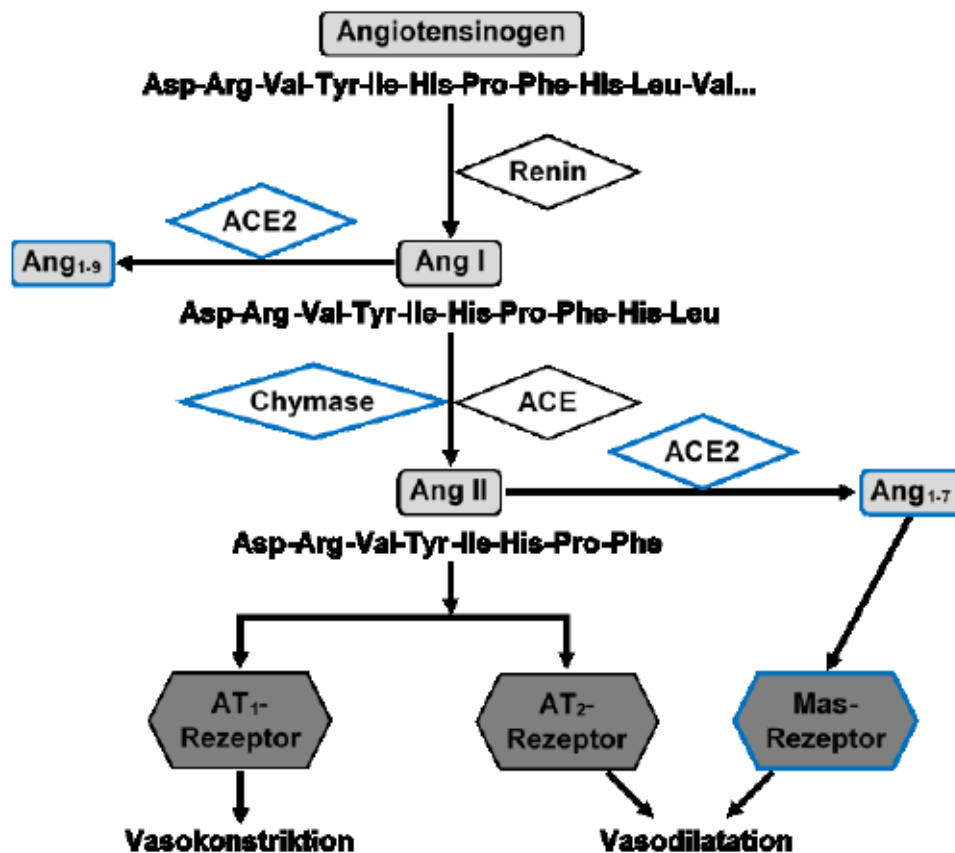


Abbildung 1.1: Das klassische RAAS (in schwarz) und die neueren Komponenten des RAAS (in blau) zur Regulation des Blutdrucks

Neben der Unterteilung in das klassische und neue RAAS kann auch generell zwischen einem systemischen und einem lokalen RAAS unterschieden werden. Das Vorhandensein eines lokalen organspezifischen RAAS konnte in verschiedenen Zellen und Geweben z.B. für das Herz, große Blutgefäße, die Niere, das Gehirn und weitere Organe nachgewiesen werden. Dessen Aktivierung führt zu strukturellen und funktionellen Veränderungen, welche jedoch unabhängig von denen sind, die vom systemischen endokrinen RAAS hervorgerufen werden (Santos et al., 2009; De Mello & Frohlich, 2014). Dem lokalen RAAS wird zudem, im Gegensatz zum systemischen RAAS, im besonderen Maße eine Beteiligung am vaskulären Remodeling (Umbauprozessen) zugesprochen (Paul et al., 2006; Wu et al., 2015).

Aus dem oben beschriebenen komplexen RAAS ist das Enzym ACE für die vorliegende Arbeit besonders interessant. Aus diesem Grund wird im Weiteren detaillierter auf den Aufbau und die Funktionen des ACE eingegangen.

1.2.2 ACE

ACE ist eine Dipeptidyl-Carboxypeptidase (*Enzyme Commission number* 3.4.15.1) (Wijesekara & Kim, 2010) und spielt, wie bereits beschrieben, eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des Blutdrucks. Hauptsächlich ist das ACE membrangebunden auf Endothelzellen zu finden, weswegen die Lunge besonders viel ACE aufweist (Bader, 2010). Vom humanen ACE sind zwei Formen (somatisches und testikuläres ACE) bekannt. Beide werden durch das gleiche Gen (auf Chromosom 17q23), jedoch durch unterschiedliche Promotoren codiert. Das somatische ACE (170 kDa) wird vom somatischen Gewebe gebildet (Eyries et al., 2001; Riordan, 2003) und ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Es besteht aus einer 30 Aminosäuren großen C-terminalen intrazellulären Region, einem hydrophoben transmembranen Segment (17 Aminosäuren) und einer aus 1230 Aminosäuren bestehenden N-terminalen extrazellulären Region (Wei et al., 1991a; Eyries et al., 2001). Das somatische ACE besitzt zwei hydrophobe Segmente. Das erste ist am N-Terminus und weist die Eigenschaften eines Signalpeptids auf. Bei dem zweiten hydrophoben Segment handelt es sich, wie bereits dargestellt um das transmembrane Segment nahe des C-Terminus, wodurch das ACE membrangebunden vorliegt. Durch eine proteolytische (oder post-translationale) Spaltung der Membranbindung kann das ACE jedoch auch löslich (systemisch) im Plasma oder anderen Körperflüssigkeiten vorliegen (Wei et al., 1991b). Der extrazelluläre Teil des ACE besteht aus zwei homologen katalytischen Domänen, der sogenannten Amino- oder N-Domäne und der Carboxyl- oder C-Domäne (Abbildung 1.2) (Eyries et al., 2001; Riordan, 2003).

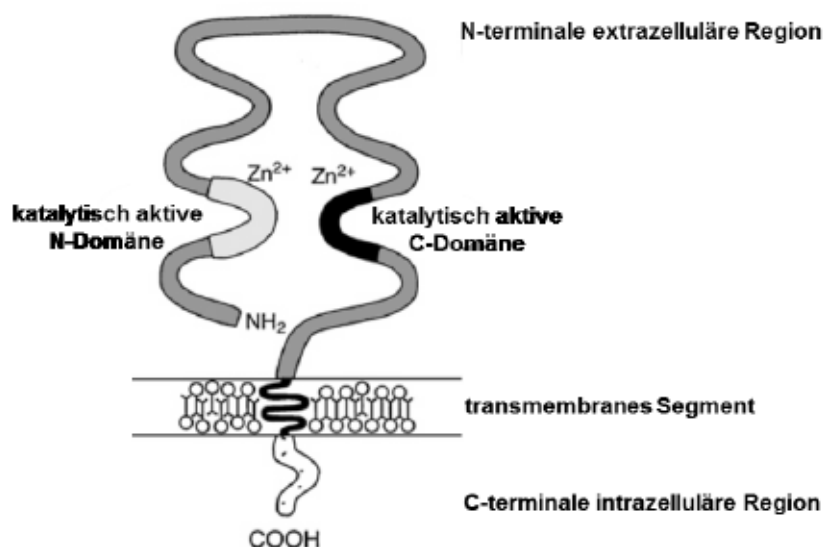


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Struktur vom somatischen ACE mit seinen verschiedenen Regionen und den beiden katalytisch aktiven Domänen, welche jeweils ein Zink-Ion (Zn^{2+}) binden können (modifiziert nach Dzau et al., 2002)

Die Sequenz der N- und C-Domäne im somatischen ACE ist zu mehr als 60 % identisch. Außerdem enthalten beide Domänen ein HEXXH Sequenzmotiv (wobei X für eine beliebige Aminosäure steht), indem die beiden Histidinreste als zinkbindende Liganden dienen und die Glutaminsäure essentiell für die katalytische Aktivität ist (Abbildung 1.3) (Wei et al., 1991a; Riordan, 2003).



Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des somatischen ACE mit dem hydrophoben Signalpeptid (blau), aktiven Zentrum der katalytisch aktiven Domänen (rot), transmembranen Segment (schwarz) und der intrazellulären Region (grau) (modifiziert nach Riordan, 2003)

Das ACE kann verschiedene Substrate umsetzen, wobei die katalytischen Eigenschaften für die jeweiligen Substrate unterschiedlich sind. Ang I und Bradykinin zählen zu den physiologisch wichtigsten Substraten des ACE (Jaspard et al., 1993). Wei et al. zeigten 1991, dass beide Domänen unabhängig voneinander katalytisch aktiv sind (Wei et al., 1991a). Beide sind in der Lage, das C-terminale Dipeptid HL von dem Substrat Ang I bzw. einem Analogon Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin (Hip-HL) abzuspalten. Das Vorhandensein von Zink ist für die Aktivität beider Domänen unabdingbar, ebenso wird die Aktivität der beiden Domänen durch Chlorid reguliert. So zeigte sich bei einer hohen Chloridkonzentration (30 mM Cl⁻), dass Ang I von der C-Domäne schneller hydrolysiert wurde als von der N-Domäne. Die N-Domäne wird als weniger Chlorid-abhängig im Vergleich zu der C-Domäne diskutiert (Wei et al., 1991a). Zudem wurde aus den Daten geschlossen, dass unter physiologischen Bedingungen im vaskulären und extrazellulären Raum, in dem eine hohe Chloridkonzentration vorliegt, die C-Domäne wahrscheinlich hauptverantwortlich für die Spaltung von Ang I ist. Hingegen könnte die Hydrolyse von Ang I intrazellulär (Chloridkonzentration ist geringer als 10 mM) größtenteils von der N-Domäne vermittelt sein (Wei et al., 1991a; Jaspard et al., 1993). Die Hydrolyse von Bradykinin ist hingegen weniger Chlorid-abhängig (Jaspard et al., 1993).

Generell können die beiden physiologischen Substrate Ang I und Bradykinin von beiden Domänen umgesetzt werden, aber es wurden unterschiedliche hydrolytische Aktivitäten der beiden Domänen festgestellt. Ang I wird *in vitro* 3-mal schneller von der C-Domäne (katalytische Konstante (k_{cat}): 34 s⁻¹) hydrolysiert als von der N-Domäne (k_{cat} : 11 s⁻¹). Somit

ist die C-Domäne effektiver bei der Umwandlung von Ang I zu Ang II (Wei et al., 1991a). Das Bradykinin wird von beiden Domänen im etwa gleichen Maße hydrolysiert (C-Domäne k_{cat} : 8 s^{-1} ; N-Domäne k_{cat} : 5 s^{-1}) (Jaspard et al., 1993). Weiterhin konnten Jaspard et al. zeigen, dass Bradykinin als Substrat eine höhere Affinität zu den beiden Domänen des ACE hat (Michaelis-Menten-Konstante (K_m): $0,24\text{--}0,54 \text{ }\mu\text{M}$) verglichen mit dem Substrat Ang I (K_m : $5\text{--}18 \text{ }\mu\text{M}$) (Wei et al., 1991a; Jaspard et al., 1993).

Neben dem somatischen ACE gibt es das testikuläre ACE (110 kDa), welches ausschließlich in den männlichen Keimzellen gebildet wird. Dem testikulären ACE fehlt die extrazelluläre N-Domäne (Abbildung 1.4) (Eyries et al., 2001; Riordan, 2003).

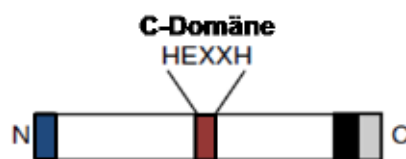


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des testikulären ACE mit dem hydrophoben Signalpeptid (blau), aktiven Zentrum der katalytisch aktiven Domäne (rot), transmembranen Segment (schwarz) und der intrazellulären Region (grau) (modifiziert nach Riordan, 2003)

Das testikuläre ACE ist nicht an der Blutdruckregulierung beteiligt. Diesem ACE werden hingegen wichtige Aufgaben bei der Fertilität zugeschrieben. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass das testikuläre ACE wichtig für die *in vivo* Befruchtung ist. Spermien von testikulären ACE-defizienten Mäusen wiesen Defekte beim Transport im Eileiter auf und konnten nicht richtig an die Schutzhülle der Eizelle (*Zona pellucida*) binden, was beides essentiell für die Befruchtung ist (Hagaman et al., 1998). Außerdem zeigten Hagaman et al., dass das somatische ACE bei diesen Mechanismen der Fertilität keine Rolle spielt. Die Fertilität von somatischen ACE-defizienten Mäusen, welche jedoch ein normales Level des testikulären ACEs aufwiesen, unterschied sich nicht von der Fertilität von Wildtypmäusen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Ang I die Fertilität ebenfalls nicht beeinträchtigt wurde. Daraus wurde geschlossen, dass Ang I kein wesentliches Substrat für das testikuläre ACE darstellt (Hagaman et al., 1998).

1.2.3 Kallikrein-Kinin-System

Neben dem RAAS gibt es auch das KKS, welches an der Blutdruckregulierung beteiligt ist (Abbildung 1.5). Das KKS hat physiologisch gesehen jedoch eher eine untergeordnete Rolle bei der Blutdruckregulierung, was sich unter pathophysiologischen Bedingungen dagegen ändern kann (Rhaleb et al., 2011). Das System wurde 1909 von Abelous und Bardier durch die Feststellung, dass die Injektion von Urin (reich an Kininen) zu einer Reduzierung des Blutdrucks führte, entdeckt (Abelous & Bardier, 1909; Su, 2014). Jedoch wurde erst 1930 Kininogen im Urin identifiziert. Kinine werden aus Kininogenen durch verschiedene Enzyme (Kininogenasen) gebildet. Im KKS wird Bradykinin (Kinin) durch Kallikrein (aus dem Gewebe oder Plasma) aus Kininogen produziert (Su, 2014). Neben der Generierung von Bradykinin ist Kallikrein auch in der Lage, Prorenin zu Renin umzuwandeln und greift somit direkt ins RAAS ein (Bryant & Shariat-Madar, 2009). Bradykinin wird durch Kininasen schnell zu inaktiven Peptiden metabolisiert. ACE (auch bekannt als Kininase II) ist in der Lage, Bradykinin zu inaktivieren, indem es dieses in inaktive Produkte spaltet. Da Bradykinin im Allgemeinen im Gewebe synthetisiert wird, ist der Anteil an Bradykinin im Gewebe höher als im Blut, da es erst durch die Freisetzung aus dem Gewebe zirkuliert (Su, 2014). Bradykinin wirkt normalerweise über zwei verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Bradykinin Rezeptor 1 (B₁-Rezeptor) und Bradykinin Rezeptor 2 (B₂-Rezeptor)). Der B₁-Rezeptor ist im Gewebe lediglich gering oder gar nicht exprimiert, wird jedoch z.B. während Inflammation oder Verletzung vom Gewebe hochreguliert. Der B₂-Rezeptor vermittelt die meisten Effekte von Bradykinin und ist somit dessen Hauptrezeptor (Rhaleb et al., 2011). Beide Rezeptoren bewirken eine Freisetzung von NO in Endothelzellen. Über den B₂-Rezeptor werden noch zusätzlich verschiedene Vasodilatoren, wie z.B. Prostaglandin I₂ (Prostacyclin, PGI₂), gebildet. Bradykinin senkt demnach den Blutdruck, wird aber durch ACE schnell abgebaut, sodass die vasodilatierende Wirkung verloren geht (Bryant & Shariat-Madar, 2009; Majumder & Wu, 2015). Zwischen dem KKS und dem RAAS gibt es verschiedene Schnittstellen, bei denen die Systeme zusammen wirken (Abbildung 1.5). Die Kinine scheinen, wie bereits erwähnt, nicht entscheidend für die Regulation des Blutdrucks oder gar notwendig für die Entwicklung von Bluthochdruck zu sein. Auch wenn die Datenlage widersprüchlich ist, scheint es, dass eine Blockade des KKS keinen Bluthochdruck zur Folge hat (Rhaleb et al., 2011).

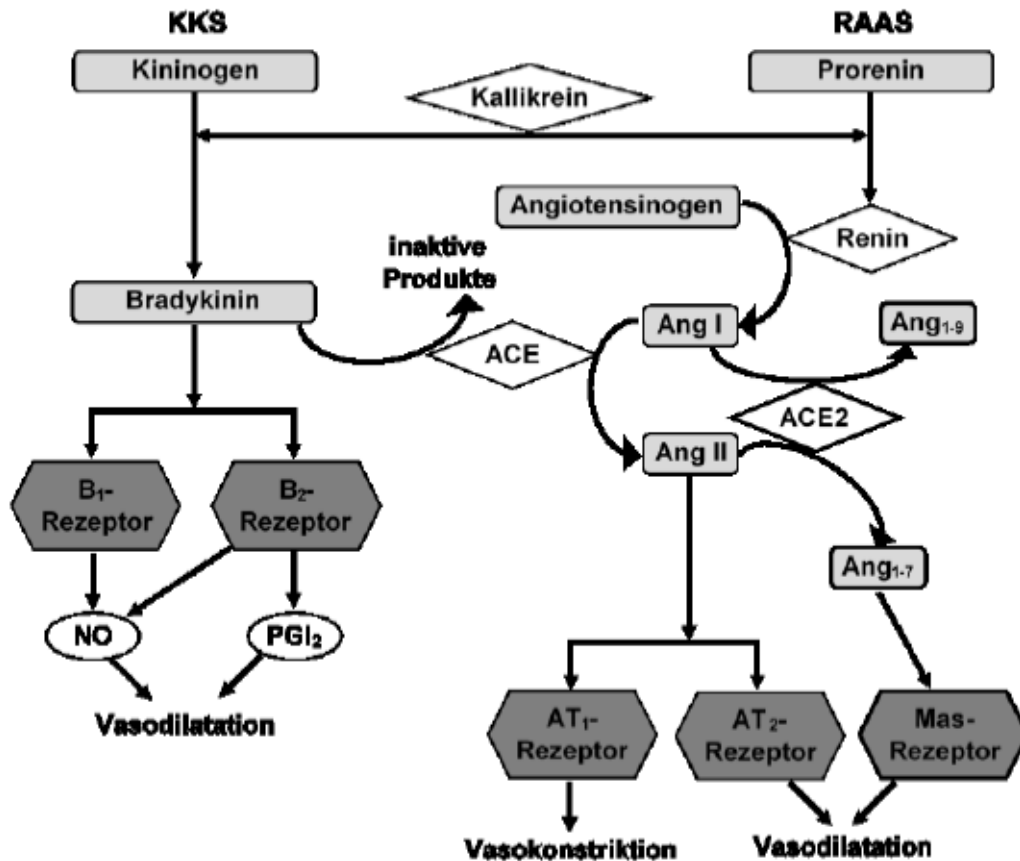


Abbildung 1.5: Darstellung der beiden Systeme KKS und RAAS zur Regulierung des Blutdrucks (modifiziert nach Majumder & Wu, 2015)

1.3 Behandlung von Bluthochdruck

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, den Blutdruck zu regulieren bzw. zu reduzieren. Patienten mit Bluthochdruck bis 179/109 mm Hg und \leq zwei Risikofaktoren (z.B. Geschlecht, Alter, Übergewicht, Rauchen) oder Prähypertonikern wird zunächst eine Lebensstiländerung empfohlen (Mancia et al., 2013). Laut dem 7. Bericht des *Joint National Committee JNC 7* schließt das eine reduzierte Natriumaufnahme (weniger als 2,4 g/Tag), sportliche Betätigung (vier Tage in der Woche mind. 30 min), eine Reduzierung des Alkoholkonsums, eine Gewichtsnormalisierung und eine Reduzierung von bestimmten Lebensmitteln (gesättigte Fettsäuren, Cholesterin) ein. Außerdem sollte generell auf eine gesunde und ausgewogene Ernährung geachtet werden (Chobanian et al., 2003; Wexler & Aurkerman, 2006).

Falls eine Veränderung des Lebensstils jedoch nicht ausreichend ist, um den Blutdruck akzeptabel zu senken ($< 140/90$ mm Hg), gibt es verschiedene Möglichkeiten, diesen

medikamentös zu behandeln. Laut ESH/ESC-Leitlinien gibt es für das Management der arteriellen Hypertonie fünf große Substanzklassen (Diuretika, Betablocker, Calciumantagonisten, ACE-Inhibitoren und AT₁-Rezeptorblocker), welche als Mono- oder Kombinationstherapie eingesetzt werden können (Mancia et al., 2013). Hierbei kommt Medikamenten, die über das RAAS auf eine Blutdrucknormalisierung wirken, eine besondere Bedeutung zu, wobei innerhalb des RAAS an verschiedenen Stellen pharmakologisch eingegriffen werden kann. Bereits die Bildung und Freisetzung von Renin kann mittels Renin-Inhibitoren blockiert werden. Weiterhin ist es möglich, die Umwandlung von Ang I zu Ang II mittels ACE-Inhibitoren zu hemmen. Schließlich kann die Bindung des gebildeten Ang II an den AT₁-Rezeptor mit AT₁-Rezeptorblockern verhindert werden. Zudem gibt es selektive Aldosteron-Rezeptor Agonisten, welche die Wirkung von Aldosteron minimieren. Besonders ACE-Inhibitoren und AT₁-Rezeptorblocker sind nicht nur bei der Therapie von Bluthochdruck bewährt, sondern werden umfangreich z.B. auch bei der Behandlung von Herzinsuffizienz, nach Myokardinfarkten und bei Herz-Remodeling eingesetzt (Zaman et al., 2002).

Da ein Schwerpunkt der Arbeit auf der ACE-hemmenden Aktivität von Peptiden liegt und ACE-Inhibitoren auch erste Wahl bei der Therapie von Bluthochdruck sind, wird im weiteren Abschnitt genauer auf die Wirkung von synthetischen ACE-Inhibitoren eingegangen.

1.3.1 Synthetische ACE-Inhibitoren

Die ersten ACE-hemmenden Peptide wurden bereits in den 60er Jahren aus dem Gift der brasilianischen Schlange *Bothrops jararaca* isoliert (Ferreira, 1965). Doch erst durch die Strukturaufklärung der aktiven Domänen des ACE und dem Design von potentiellen Hemmstoffen wurde Captopril als erster oraler ACE-Inhibitor synthetisiert (Ondetti et al., 1977). Mittlerweile gibt es neben Captopril viele verschiedene ACE-Inhibitoren, welche therapeutisch eingesetzt werden (z.B. Enalapril, Lisinopril oder Ramipril) (Zaman et al., 2002).

ACE-Inhibitoren wirken durch ihre reversible Bindung an die aktiven Domänen von ACE und verhindern die Bindung von Substraten und damit deren Spaltung (Zaman et al., 2002). Die meisten ACE-Inhibitoren weisen die gleiche Grundstruktur auf. Sie unterscheiden sich jedoch in ihren funktionellen Liganden, welche Wechselwirkungen mit den aktiven Domänen des ACE eingehen, indem diese unter anderem im aktiven Zentrum das Zink-Ion binden können. Bei den funktionellen Liganden handelt es sich entweder um eine Sulfhydrylgruppe (Captopril), eine Phosphorylgruppe (Fosinopril) oder meist um eine Carboxylgruppe (z.B. Lisinopril, Enalapril) (White, 1998; Piepho, 2000). Durch die verschiedenen Liganden können sich die ACE-Inhibitoren in ihren pharmakokinetischen

Eigenschaften, wie der Dauer der ACE-Hemmung, Absorption, Halbwertszeit im Serum, Proteinbindung und metabolischer Disposition unterscheiden (Tabelle 1.2) (Zaman et al., 2002).

Tabelle 1.2: Pharmakokinetische Eigenschaften von ausgewählten synthetischen ACE-Inhibitoren (modifiziert nach Zaman et al., 2002)

ACE-Inhibitor	Maximum hypotensiver Effekt (h)	Proteinbin- dung (%)	Serum Halbwertszeit (h)	Eliminierung
Captopril	1-1,5	25-30	< 2	Niere
Lisinopril	6	10	13	Niere
Enalapril	4-6	50	11	Niere
Fosinopril	2-6	95	11	Niere und Leber
Ramipril	3-6	73	13-17	Niere

Generell können die ACE-Inhibitoren in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen gibt es Substanzen die direkt als ACE-Inhibitoren wirken wie beispielsweise Captopril und Lisinopril. Während Enalapril und Ramipril zu den sogenannten *Prodrugs* zählen. Das bedeutet, dass diese in einer inaktiven meist veresterten Form vorliegen und erst nach der Metabolisierung in der Leber zu wirksamen ACE-Inhibitoren hydrolysiert werden (White, 1998).

ACE-Inhibitoren sind Substanzen der ersten Wahl bei der Therapie von Bluthochdruck (Bader, 2010), aber auch bei der Behandlung von Herzinsuffizienz, diabetischer Nephropathie oder linksventrikulärer Dysfunktion werden sie eingesetzt. Randomisierte kontrollierte Studien zeigten, dass durch Gabe von ACE-Inhibitoren eine Verminderung der Morbidität und Mortalität durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei Patienten mit Hypertonie, linksventrikulärer Dysfunktion nach Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz und atherosklerotisch bedingten Herz-Kreislauf-Erkrankungen möglich ist (Zaman et al., 2002). Eine Metaanalyse von vier randomisierten Placebo-kontrollierten Studien an insgesamt 12.124 Patienten (meist mit koronarer Herzerkrankung) zeigte eine Reduktion von Schlaganfällen um 30 %, von koronaren Herzerkrankungen um 20 % und von kardiovaskulären Ereignissen (z.B. Myokardinfarkt) um 21 % durch die Gabe von ACE-Inhibitoren (Neal et al., 2000). In einer weiteren Studie mit über 9.000 Hoch-Risikopatienten (Vorliegen einer Gefäßerkrankung oder Diabetes + einem weiteren kardiovaskulärem Risikofaktor), in der den Teilnehmern über fünf Jahre Ramipril (10 mg/Tag) oder ein Placebo verabreicht wurde, traten signifikante Reduktionen von Mortalitätsrate, Myokardinfarkt, Schlaganfall oder durch

Diabetes bedingte Komplikationen bei Einnahme von Ramipril im Vergleich zu Placebo auf (Yusuf et al., 2000). Der Einsatz von ACE-Inhibitoren hat demnach neben einer Blutdruckregulierung weitere Vorteile. So zeigten Patienten, welche direkt nach einem akuten Myokardinfarkt ACE-Inhibitoren erhielten, eine signifikant niedrigere Mortalitätsrate, eine verringerte Entwicklung von Herzversagen und eine Reduktion der Re-Infarktrate. Außerdem wurden in dieser Studie ebenso positive Auswirkungen auf das ventrikuläre Remodeling ermittelt (De Mello & Frohlich, 2014). Einiges weist darauf hin, dass der positive Effekt von ACE-Inhibitoren auch durch Kinine (Bradykinin bleibt in seiner aktiven Form erhalten) vermittelt sein kann. Beim Myokardinfarkt oder bei der Herzinsuffizienz spielen Kinine, durch deren stimulierende Wirkung auf die NO-Produktion, für die Vermittlung vieler positiver Effekte von ACE-Inhibitoren eine Rolle (Rhaleb et al., 2011).

Dennoch haben pharmakologische ACE-Inhibitoren auch erhebliche Nebenwirkungen. Die bereits erwähnte Anreicherung von Bradykinin wird für viele der Nebenwirkungen, wie trockener Husten oder die Bildung von Angioödem (Gabb et al., 1996) verantwortlich gemacht (Zaman et al., 2002; Wijesekara & Kim, 2010). Ein weiterer Punkt ist, dass ACE-Inhibitoren nicht während der Schwangerschaft oder bei Frauen, die beabsichtigen schwanger zu werden, zur Blutdrucksenkung eingesetzt werden dürfen, weil diese die fetale Entwicklung des Kindes nachteilig beeinflussen (Chobanian et al., 2003). Bei Säuglingen, welche lediglich im ersten Trimester einer fetalen Exposition von ACE-Inhibitoren ausgesetzt waren, wurde ein erhöhtes Risiko zur Ausprägung von kongenitalen Fehlbildungen festgestellt (Cooper et al., 2006). Das RAAS hat eine große Bedeutung für die embryonale Nierenfunktion, was sich an den dramatischen Folgen zeigt, welche durch die Gabe von ACE-Inhibitoren während der Schwangerschaft auftreten können (Michaud et al., 2014). So scheinen die negativen Effekte für die fetale Entwicklung durch ACE-Inhibitoren in der späten Schwangerschaft (2-3 Trimester) noch deutlicher zu sein und können sich z.B. in Nierenversagen, einer Nierendysplasie, einer renalen tubulären Dysgenese, einer Unterentwicklung der Schädeldecke und der Lunge, einer Oligohydramnion (verminderte Fruchtwassermenge), einer Anurie, einer Hypotension sowie als Fruchttod (fetal) oder Tod kurz nach Geburt äußern (Buttar, 1997; Quan, 2006). Einige der Fehlbildungen scheinen durch eine schwere Hypotonie und eine renale Hypoperfusion bedingt zu sein (Quan, 2006; Michaud et al., 2014).

Wie beschrieben haben ACE-Inhibitoren neben der Senkung des Blutdrucks auch andere erwünschte Effekte. Dennoch gibt es verschiedene Bereiche, in denen eine Gabe von ACE-Inhibitoren auf Grund der Nebenwirkungen kontraindiziert ist. Aus diesem Grund ist es notwendig, innovative und sicherere ACE-Inhibitoren zu entwickeln, welche vor allem in der Prävention, aber auch zusätzlich zur Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt werden

können. Von besonderem Interesse sind hier natürliche ACE-Inhibitoren, wie z.B. bioaktive Peptide und Proteine.

1.4 Bioaktive Peptide

1.4.1 Allgemein

Bioaktive Peptide sind unter anderem in der Sequenz von Nahrungsmittelproteinen enthalten und können eine physiologische Wirkung auf den Körper haben. Die Peptide haben meist eine Größe zwischen 2-50 Aminosäuren (Wijesekara & Kim, 2010; Hernández-Ledesma et al., 2011). Sie können enzymatisch während der gastrointestinalen Verdauung, der Fermentation oder bei der Lebensmittelverarbeitung freigesetzt werden (Wijesekara & Kim, 2010). Es kann jedoch auch eine gezielte enzymatische Hydrolyse zur Entstehung von bioaktiven Peptiden aus Nahrungsmittelproteinen genutzt werden. Falls die Sequenz der Peptide bekannt ist, können diese auch mittels chemischer Synthese oder rekombinant durch Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Technologie hergestellt werden (Hernández-Ledesma et al., 2011). Es gibt eine Vielzahl von bioaktiven Peptiden mit ganz unterschiedlichen z.B. antimikrobiellen (Battison et al., 2008), antithrombotischen oder antioxidativen (Khiari et al., 2014) Eigenschaften. Bioaktive Peptide, welche die wichtigen Prozesse im Körper wie das Herz-Kreislauf-, Verdauungs-, Hormon- oder Immunsystem beeinflussen können, sind Gegenstand aktueller Forschungen. Besonders ACE-hemmende Peptide stehen hierbei im Fokus und im Weiteren wird auf diese Peptide genauer eingegangen.

1.4.2 ACE-hemmende Peptide

Bioaktive Peptide mit antihypertensiver Aktivität wirken hauptsächlich über die Hemmung des ACE (Majumder & Wu, 2015). In verschiedenen Nahrungsmittelproteinen, wie z.B. aus Fisch, Ei oder pflanzlichen Proteinen, konnten ACE-hemmende Peptide identifiziert werden (Shin et al., 2001; Miguel et al., 2005; Balti et al., 2015). Jedoch sind besonders Milchproteine reich an ACE-hemmenden Peptiden (FitzGerald & Meisel, 2000). Es sind bereits fermentierte Milchprodukte als Getränke auf dem japanischen Markt (Produkt Calpis®) und in Finnland (Produkt Evolus®) erhältlich, welche die beiden bekanntesten antihypertensiven Peptide VPP und IPP enthalten (Hernández-Ledesma et al., 2011). Für die Peptide VPP und IPP konnten *in vitro* IC₅₀-Werte von 9 µM bzw. 5 µM bestimmt werden (Nakamura et al., 1995). Der IC₅₀-Wert beschreibt die Inhibitor-Konzentration, welche benötigt wird, um die Enzymaktivität zu 50 % zu hemmen. Hierbei weist ein Peptid mit einem niedrigen IC₅₀-Wert ein hohes Hemmpotenzial auf (hohe Affinität zur Bindungsstelle des zu

hemmenden Proteins). In Tabelle 1.3 sind noch weitere tryptophan-, tyrosin- und prolinhaltige Peptide gelistet, welche einen niedrigen *in vitro* bestimmten IC₅₀-Wert aufweisen.

Tabelle 1.3: ACE-Hemmung *in vitro* von tryptophan-, tyrosin- und prolinhaltigen Peptiden

Peptidsequenz	IC ₅₀ (μM)	Referenz
AW	10	Cheung et al., 1980
GW	30	Cheung et al., 1980
IPP	5	Nakamura et al., 1995
IW	0,7	Martin et al., 2008
IY	6,1	Sato et al., 2002
LW	23,6	Sato et al., 2002
RW	16	Cheung et al., 1980
VPP	9	Nakamura et al., 1995
VW	1,6	Cheung et al., 1980
VY	22	Cheung et al., 1980
WL	10	Martin et al., 2008
WY	38,3	Hernández-Ledesma et al., 2007

Abgesehen von einer Wirkung *in vitro* ist besonders entscheidend, dass auch in verschiedenen *in vivo* Studien sowohl am Tier als auch am Menschen gezeigt werden konnte, dass ACE-hemmende Peptide aus Nahrungsmittelproteinen nach oraler oder intravenöser Gabe in der Lage sind, den Blutdruck signifikant zu senken (Shin et al., 2001; Miguel et al., 2005; Boelsma & Klok, 2010). In verschiedenen Studien mit Ratten (Sipola et al., 2002; Jauhiainen et al., 2005) und in Humanstudien (Seppo et al., 2003; Cicero et al., 2013) zeigten fermentierte Milchprodukte, welche die bereits erwähnten Peptide VPP und IPP enthielten, einen blutdrucksenkenden Effekt. Ein weiteres Tripeptid (IRW), welches nach der enzymatischen Hydrolyse des Eiweißproteins Ovotransferrin freigesetzt wurde, zeigte eine ACE-hemmende Aktivität *in vivo* verknüpft mit einer signifikanten Senkung des Blutdrucks in spontan hypertensiven Ratten (SHR) bei oraler Gabe über 18 Tage (15 mg/kg Körpergewicht (KG)) im Vergleich zur Kontrolle (Majumder et al., 2013). Auch das Peptid TQVY, welches aus dem mit dem Enzym Alcalase hydrolysierten Reisprotein isoliert werden konnte führte *in vivo* (30 mg/kg KG) zu einem antihypertensiven Effekt. Bei der Behandlung von SHR resultierte eine signifikante Reduzierung des Blutdrucks von bis zu etwa systolisch 40 mm Hg bei einmaliger oraler Verabreichung (Li et al., 2007). Aus diesem Grund könnten Peptide mit antihypertensiver Wirkung eine effektive Anwendung als funktionelles

Lebensmittel darstellen, um präventiv Bluthochdruck entgegenzuwirken oder die Entwicklung von Bluthochdruck hinauszuzögern.

Strukturell scheinen verzweigtkettige Aminosäuren (Isoleucin und Leucin) oder aber Cystein und Glycin am N-Terminus und Prolin, Tyrosin, Tryptophan, Arginin, Phenylalanin oder Lysin am C-Terminus besonders günstig für eine ACE-Hemmung zu sein (Cheung et al., 1980; Kobayashi et al., 2008; Nongonierna & FitzGerald, 2015). Generell zeigten tryptophan-, tyrosin- und prolinhaltige Peptide *in vitro* und *in vivo* sehr gute ACE-hemmende Eigenschaften (Cheung et al., 1980; Martin et al., 2008, 2015; Majumder et al., 2013). Besonders das Dipeptid IW zeigt einen starken Effekt mit einem IC_{50} -Wert von $0,7 \mu M$, welcher besser ist, als die IC_{50} -Werte der bereits häufig klinisch und präventiv eingesetzten Peptide IPP und VPP (Tabelle 1.3). Aus diesem Grund soll im folgenden Abschnitt auf das ACE-hemmende Dipeptid IW genauer eingegangen werden.

1.4.3 Isoleucin-Tryptophan

Das Dipeptid IW (Abbildung 1.6), welches in der Sequenz des bovinen Molkenprotein α -Lactalbumin vorliegt, wurde, wie bereits erwähnt, mit einem *in vitro* IC_{50} -Wert von $0,7 \mu M$ als eines der stärksten ACE-hemmenden Peptide aus Nahrungsmitteln identifiziert (Martin et al., 2008), wodurch IW äußerst attraktiv für eine mögliche Wirkung *in vivo* erscheint.

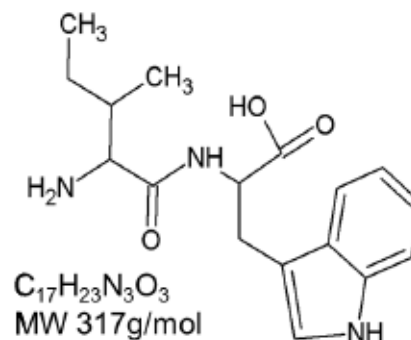


Abbildung 1.6: Struktur von IW

In SHR wurde der Einfluss einer 14-wöchigen oralen Applikation von IW (19 mg/kg KG pro Tag), eines IW-haltigen Molkenproteinhydrolysats (HYD) (770 mg/kg KG pro Tag entsprechend 3 mg IW/g Hydrolysats), des intakten Molkenproteins (Wprot) (770 mg/kg KG pro Tag) und des synthetischen ACE-Inhibitors Captopril (69 mg/kg KG pro Tag, Positivkontrolle) im Vergleich zu einer Placebogruppe auf die altersabhängige pathologische Erhöhung des systolischen Blutdrucks in SHR und die ACE-Aktivität untersucht. Im Versuchszeitraum trat eine signifikante Senkung des systolischen

Blutdrucks in den SHR bei Gabe von Captopril, IW und des Molkenproteinhydrolysats im Vergleich zur Placebogruppe und zur Gruppe, die das intakte Molkenprotein erhielt, auf (Abbildung 1.7). Für eine effektive Wirkung *in vivo* ist es demnach nötig, das Molkenprotein vor der Einnahme enzymatisch zu hydrolysieren, damit die ACE-hemmenden Peptide ihre Hemmwirkung entfalten können (Martin et al., 2015).

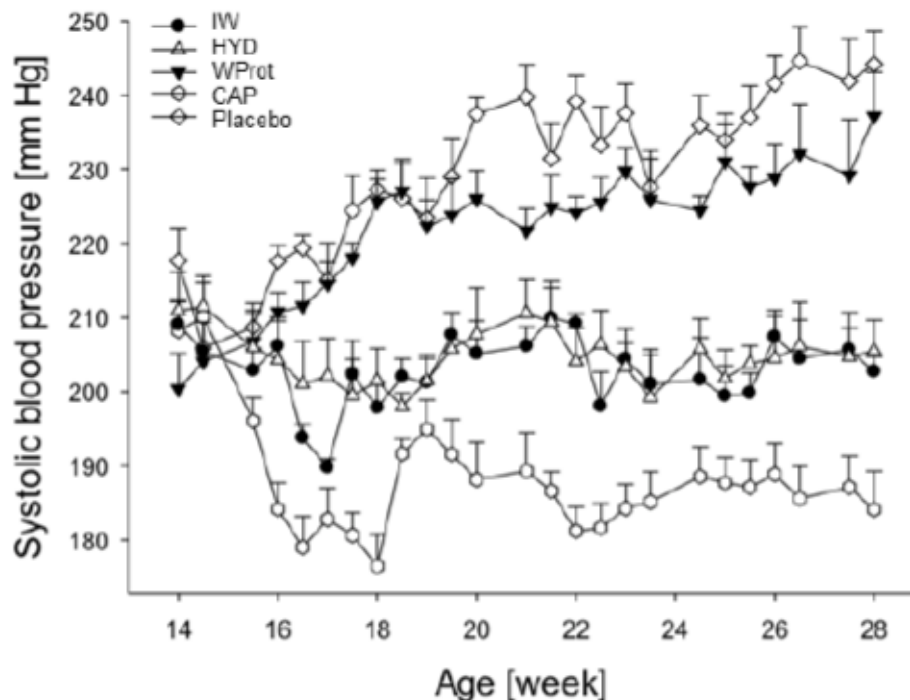


Abbildung 1.7: Entwicklung des systolischen Blutdrucks von SHR während einer 14-wöchigen oralen Applikation von IW, des Molkenproteinhydrolysats (HYD), des intakten Molkenproteins (WProt) und des synthetischen ACE-Inhibitors Captopril (CAP) im Vergleich zum Placebo (Martin et al., 2015)

Der antihypertensive Effekt von IW wurde mit einer verringerten ACE-Aktivität im Plasma sowie in der Aorta und einer Minimierung des myokardialen Remodelings assoziiert (Martin et al., 2015).

Doch nicht nur *in vitro* und im Tiermodell konnte die Wirksamkeit von IW demonstriert werden. Von besonderem Interesse ist vor allem die Wirksamkeit beim Menschen im Hinblick auf eine perspektivisch präventive Applikation von IW. Bei freiwilligen Probanden konnte nach oraler Gabe von IW gezeigt werden, dass das Dipeptid resorbiert wurde und sich parallel zur Zunahme der Plasmakonzentration eine ACE-Hemmung im Plasma zeigte (Kaiser et al., 2016).

Da die Wirkung von IW sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte, ist das Dipeptid äußerst interessant in Hinsicht auf dessen Einsatz in einem funktionellen Lebensmittel. Um dies jedoch umsetzen zu können, müsste IW in einer ausreichend großen Menge und vor allem auch lebensmittelkonform hergestellt werden. Im nächsten Abschnitt soll deshalb auf verschiedene etablierte Techniken eingegangen werden, welche die Herstellung eines Dipeptids generell ermöglichen und im Hinblick auf eine Verwendung zur IW-Produktion kritisch betrachtet werden.

1.5 Herstellung von Dipeptiden

Für die Herstellung von Dipeptiden können verschiedene Verfahren angewendet werden (Abbildung 1.8). Diese reichen von natürlichen Prozessen (z.B. beim Reifungsprozess von Lebensmitteln) bis hin zu gezielten chemischen Methoden der Peptidsynthese oder neueren biotechnologischen Ansätzen. Je nach Anwendung oder Eigenschaften der gewünschten Peptide sind bestimmte Verfahren zweckmäßiger als andere. Im Kontext der Nutzung von Peptiden für die Hypertonieprävention sollte vor allem im Hinblick auf die Herstellung von bioaktiven Peptiden darauf geachtet werden, dass die Verfahren lebensmittelkonform sind.

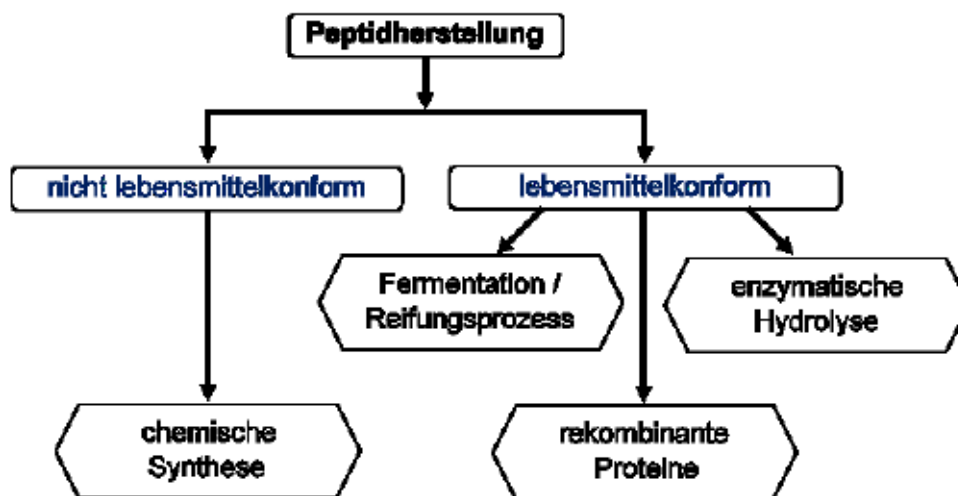


Abbildung 1.8: Mögliche Verfahren zur Herstellung von Peptiden und der Einschätzung auf deren mögliche Anwendung in Lebensmitteln

1.5.1 Chemische Synthese

Eine weit verbreitete Methode zur Herstellung von kurzkettigen Peptiden bis hin zu langkettigen Proteinen bieten verschiedene chemische Synthesemethoden. Den Durchbruch in der Peptidsynthese stellte 1963 die Entwicklung der *solid phase peptide*

synthesis (SPPS) durch Merrifield dar (Abbildung 1.9 A). Bei diesem Verfahren wird die Synthese von Peptiden mit den entsprechenden Aminosäuren Schritt für Schritt durchgeführt. Als Hilfsmittel wird eine feste Phase (Harz) z.B. aus chlormethyliertem Polystyrol verwendet, an die das wachsende Peptid binden kann. Im ersten Schritt wird die erste Aminosäure, welche temporär an der reaktiven Seitenkette und der N-terminalen Aminosäure mit Schutzgruppen versehen ist (um eine Polymerisierung zu verhindern), C-terminal an die feste Phase mittels einer kovalenten stabilen Esterbindung gebunden. Anschließend werden die Schutzgruppen abgespalten und das Harz gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen. An den freien N-Terminus der Aminosäure kann anschließend die nächste geschützte Aminosäure gebunden werden. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis das gewünschte Peptid synthetisiert ist. Zum Schluss wird das Peptid vom Harz abgespalten (Merrifield, 1963; Chandrudu et al., 2013). Bei der SPPS werden als Schutzgruppen meist *tert*-Butyloxycarbonyl und Fluorenylmethoxycarbonyl verwendet, welche durch Trifluoressigsäure oder 20 % Piperidin in Dimethylformamid wieder abgespalten werden (Carpino & Han, 1970; Chandrudu et al., 2013). Um eine Synthese von längeren Peptiden oder Proteinen realisieren zu können, wurden weitere Methoden, wie die chemische Ligation, entwickelt. Nach verschiedenen Optimierungen wird vor allem die *native chemical ligation* (NCL) verwendet (Abbildung 1.9 B), bei der zwei oder mehr ungeschützte Peptidfragmente zu einem großen Polypeptid aneinander gekoppelt werden. Für die Ligation von zwei Polypeptiden muss ein ungeschütztes Peptid N-terminal ein Cystein aufweisen, welches mit einem weiteren ungeschützten Peptid- α -Thioester reagiert, um ein Thioester-verknüpftes Zwischenprodukt zu bilden. Bei der Ligation wird dieses Zwischenprodukt durch eine Umesterung zu einer stabilen Peptidbindung ausgebildet (Transthioesterifikation und *S-N acyl shift*) (Dawson et al., 1994; Chandrudu et al., 2013).

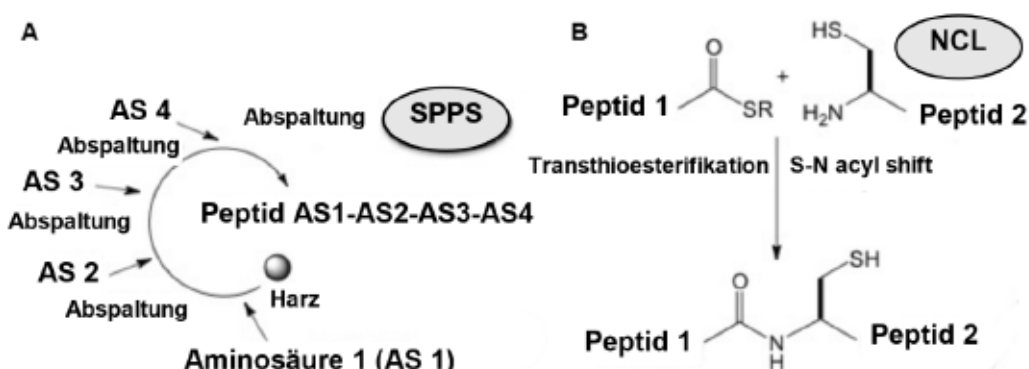


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der chemischen Peptidsynthese mit den Methoden A) SPPS und B) NCL (modifiziert nach Chandrudu et al., 2013)

Für die Pharmaindustrie ist die chemische Produktion von Peptiden und Proteinen von besonderem Interesse und momentan sind über 60 auf Peptiden basierende Medikamente auf dem Markt zugelassen, wobei die Tendenz weiterhin steigend ist (Vlieghe et al., 2010; Chandrudu et al., 2013). Auch für die Produktion von IW wäre eine chemische Synthese denkbar. Das Problem besteht jedoch darin, dass es sich hierbei um die Methode der Wahl für die pharmakologische Produktion handelt und diese nicht lebensmittelkonform ist, weshalb diese Produkte auch nicht in Lebensmitteln eingebracht werden können. Es müssen demnach alternative Verfahren für die Herstellung von IW angewandt werden, welche auch lebensmittelkonform sind.

1.5.2 Fermentation/Reifungsprozess

Bioaktive Peptide können während der Fermentation durch bestimmte Bakterien, welche eine hohe proteolytische Aktivität aufweisen, entstehen (Hernández-Ledesma et al., 2011). So hydrolysieren Milchsäurebakterien beim Fermentationsverfahren verschiedene Milchproteine und es entstehen Peptide und Aminosäuren, die die Bakterien als Stickstoffquelle für ihr Wachstum verwenden können (Juillard et al., 1998). Mittlerweile können bioaktive Peptide durch verschiedene Starterkulturen (vermehrungsfähige Mikroorganismen), die zur Herstellung von fermentierten Produkten verwendet werden, erzeugt werden (Hernández-Ledesma et al., 2011). Durch diesen Prozess werden z.B. die zwei bereits erwähnten antihypertensiven Peptide VPP und IPP gewonnen. Bei deren Produktion wird Magermilch mit verschiedenen Mikroorganismen (*Lactobacillus helveticus* und *Saccharomyces cerevisiae*) fermentiert, wodurch es unter anderem zur Freisetzung von VPP und IPP kommt (Nakamura et al., 1995).

Neben der Fermentation kann es auch bei Reifungsprozessen von Lebensmitteln zur Freisetzung von bioaktiven Peptiden kommen. Insbesondere während des Reifungsprozesses von Käse werden durch die Wirkung von Enzymen auch ACE-hemmende Peptide freigesetzt. Solche Peptide wurden z.B. in verschiedenen Käsearten wie Gouda, Edamer, Camembert, Blauschimmelkäse oder Emmentaler charakterisiert (Saito et al., 2000).

Für die Herstellung von IW im großen Maßstab scheinen diese beiden Methoden jedoch nicht geeignet zu sein. Im Moment ist kein fermentatives Verfahren mit bestimmten Starterkulturen bekannt, welche in der Lage wären, spezifisch hohe Mengen an IW freizusetzen. Und wenn bei verschiedenen Reifungsprozessen unter anderen Peptiden auch IW entstehen könnte, ist diese Menge vermutlich gering, da das Dipeptid IW in natürlichen Proteinen lediglich in sehr geringer Anzahl vorkommt (siehe 1.5.3).

1.5.3 Enzymatische Hydrolyse

Die gängigste Methode zur Produktion von bioaktiven Peptiden ist die enzymatische Hydrolyse. Hierbei wird das Gesamtprotein mit oftmals gastrointestinalen Enzymen, wie z.B. Pepsin, Chymotrypsin oder Trypsin, verdaut. Dadurch wird das Protein gespalten und bioaktive Peptide werden frei zugänglich (Hernández-Ledesma et al., 2011), welche dann ACE-hemmend wirken können.

Die bisherige Gewinnung von IW wird ebenfalls durch eine enzymatische Hydrolyse des Molkenproteins α -Lactalbumin mit den beiden Enzymen α -Chymotrypsin und Thermolysin realisiert (Lunow et al., 2013). Wenn das Dipeptid jedoch in reiner Form vorliegen soll, um es in ein Lebensmittel einzubringen, müsste eine anschließende Isolierung erfolgen, welche allerdings sehr kosten- und zeitaufwendig ist. Ein weiterer Nachteil an diesem Verfahren ist, dass in der Sequenz von bovinem α -Lactalbumin das Dipeptid IW lediglich einmal vorkommt (Sienkiewicz, 1981) und dementsprechend ist die Ausbeute an IW auch gering. In anderen natürlich vorkommenden Proteinen kommt IW ebenfalls relativ selten und nur in geringer Anzahl (ein- bis zweimal) vor (z.B. Wakame (Sato et al., 2002) oder Lachs (Darewicz et al., 2014)). Demnach wäre es vermutlich günstiger, ein Verfahren zu nutzen, welches gezielter und im größeren Maßstab eine Produktion von IW möglich macht.

1.5.4 Rekombinante Proteine

Während der letzten Jahre wurden verschiedene Techniken zur Produktion von rekombinanten Proteinen bzw. bioaktiven Peptiden entwickelt, welche mit Hilfe von Mikroorganismen (z.B. Bakterien oder Hefen) hergestellt werden.

Im folgenden Abschnitt werden die Schritte beschrieben, die notwendig sind, um rekombinante Proteine mithilfe von Bakterien zu exprimieren (Abbildung 1.10). Zunächst wird ein geeigneter Expressionsvektor (Plasmid) benötigt, welcher bestimmte Eigenschaften, wie z.B. eine Antibiotikaresistenz (zur Selektion) oder einen induktionsfähigen Promotor, aufweist. Außerdem wird DNA (isoliert aus einer natürlichen Quelle oder synthetisch hergestellt) benötigt, die das Zielgen enthält, welches das gewünschte Protein exprimiert. Der Expressionsvektor und die DNA müssen nach der Isolation mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut werden, wodurch im Expressionsvektor und dem DNA-Abschnitt zueinander komplementäre Basenpaare entstehen (Abbildung 1.10 b). Durch das Enzym Ligase kann anschließend das Gen in das Plasmid eingebaut werden (Ligation). Die komplementären Basenpaare bilden durch die Ligase kovalente Bindungen zwischen dem Phosphat und der Desoxyribose aus. Es entsteht ein neues rekombinantes Plasmid mit dem gewünschten Zielgen (Abbildung 1.10 c). Das

rekombinante Plasmid wird zur Vervielfältigung und Proteinexpression in kompetente Wirtszellen (z.B. kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*)-Zellen) über eine Transformation eingeschleust (Abbildung 1.10 d). Anschließend werden die transformierten Bakterien vermehrt und es erfolgt eine Selektion zur Identifikation positiver Klone (Abbildung 1.10 e). Im nächsten Schritt wird die positive Bakterienkolonie vermehrt. Als letztes wird das exprimierte Zielprotein gereinigt (Abbildung 1.10 f) (Kilian et al., 2012). Zur Gewinnung von Peptiden muss das Protein im Anschluss noch verdaut werden.

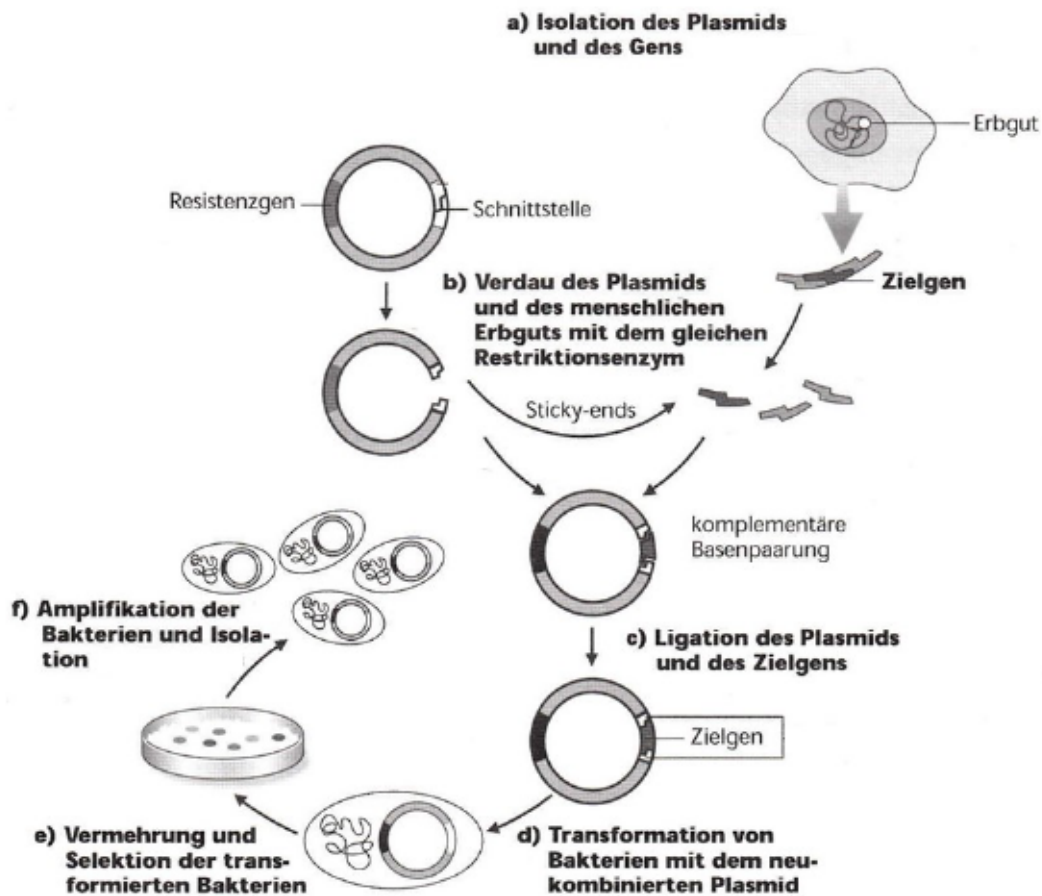


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zur Produktion von rekombinanten Proteinen in Bakterien (modifiziert nach Kilian et al., 2012)

Bei dieser Technik gibt es, wie auch bei den anderen Verfahren, verschiedene Herausforderungen, welche zu bewältigen sind. So kann z.B. das bei einer Überexpression entstandene Protein schädlich für die Wirtszelle sein oder kleine ACE-hemmende Peptide könnten von Proteasen leicht abgebaut werden. Um dem entgegen zu wirken, werden ACE-hemmende Peptide oft als Fusionsproteine exprimiert. Dazu werden zwei Gene oder Genabschnitte so hintereinander kloniert, dass sich zwischen ihnen kein Stopcodon

befindet und sie als ein großes Fusionsprotein exprimiert werden. Alternativ wird die DNA-Sequenz repetitiv einkloniert, sodass ein größeres und stabileres Protein entsteht. Trotz einiger Herausforderungen konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine erfolgreiche rekombinante Produktion von ACE-hemmenden Peptiden möglich ist (Jeong et al., 2007; Liu et al., 2007; Losacco et al., 2007).

In der Lebensmittelindustrie gibt es zudem verschiedene Beispiele für Substanzen, welche durch genetisch veränderte Mikroorganismen produziert und bereits eingesetzt werden. Bei der traditionellen Produktion von Käse wird Lab, welches aus dem Kälbermagen isoliert wird, zum Eindicken der Milch benötigt. Mittlerweile wird das Enzym Chymosin (hauptsächlich aktive Substanz von Lab) auch biotechnologisch mit Hilfe von gentechnisch veränderten Mikroorganismen hergestellt. Das Enzym wurde von der *food and drug administration* (FDA) als erste Lebensmittelzutat zugelassen, welche mit rekombinanter DNA-Technologie hergestellt wurde. Das rekombinante Chymosin wurde aus dem Stamm *E. coli* K12 gewonnen, welches das bovine Gen *Prochymosin* trägt (Flamm, 1991). Ein weiteres Enzym, welches in der Lebensmittelverarbeitung eingesetzt wird ist α -Amylase. Dieses Enzym hydrolisiert Speisestärke und findet z.B. Anwendung bei der Produktion von Maltodextrin, Süßungsmitteln oder Ethanol. Mittlerweile gibt es verschiedene genetisch veränderte Mikroorganismen, welche α -Amylase für die Lebensmittelverarbeitung produzieren können (z.B. *Pseudomonas fluorescens Biovar I*, *Bacillus subtilis* oder *Bacillus licheniformis*) (Landry et al., 2003; Olempska-Beer et al., 2006).

Die Produktion von IW mit Hilfe von rekombinanten Proteinen durch genetisch veränderte Mikroorganismen scheint äußerst vielversprechend zu sein. Es ist denkbar, dass das Zielgen so designt werden kann, dass eine höhere Anzahl von DNA-Abschnitten enthalten ist, welche für IW codieren. Somit könnte der Mangel an IW in natürlich vorkommenden Proteinen umgangen werden. Auch im Hinblick auf die Anwendung als funktionelles Lebensmittel sind rekombinante Proteine interessant, da es bereits Substanzen gibt, die gentechnisch hergestellt werden und in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden.

Aus diesem Grund werden nachfolgend die beiden verwendeten Klonierungs- und Expressionssysteme allgemein sowie die Gründe dafür vorgestellt, warum diese im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, um ein rekombinantes Protein mit einem repetitiven Anteil von IW herzustellen. Als erstes wird ein System zur Expression in *E. coli* vorgestellt, gefolgt von einem System zur Expression im Hefeorganismus *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*).

1.5.4.1 Proteinexpression in *E. coli* und *K. lactis*

Für die Produktion des gewünschten IW-repetitiven Proteins in *E. coli* wurde das pMAL Protein Fusion&Purification System von New England Biolabs gewählt. Gründe für diese Wahl sind zum einen, dass der Expressionsvektor pMAL-c5X mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden kann. Zum anderen enthält der Vektor eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin (Amp), was zur Selektion der positiven Klone genutzt wird. Ein entscheidender Vorteil ist außerdem, dass der Vektor als Affinitätstag das *Maltose Binding Protein* (MBP) für die Reinigung liefert, indem dieser das für MBP codierende Gen *malE* enthält (Vektorkarte siehe Anhang, Abbildung 8.1). Bei einer Klonierung der DNA-Sequenz, mit dem repetitiven IW-Anteil, im richtigen Leserahmen entsteht ein MBP-IW Fusionsprotein, welches nach der Expression gereinigt werden kann. Anschließend wäre es möglich, das Dipeptid IW aus dem repetitiven Fusionsprotein MBP-IW durch eine enzymatische Hydrolyse zu isolieren.

Für die Produktion des gewünschten IW-repetitiven Proteins wurde als weiteres Expressionssystem das Protein Expression Kit von New England Biolabs, zur Expression im Hefeorganismus *K. lactis*, gewählt. Nach erfolgreicher Klonierung des DNA-Abschnittes MBP-IW in die *multiple cloning site* (MCS) des Vektors pKLAC2 (Vektorkarte siehe Anhang, Abbildung 8.2) musste das neu generierte Plasmid in einen geeigneten *E. coli*-Stamm, als Zwischenschritt, transformiert werden. Nach Detektion eines positiven Klons wurde das Plasmid linearisiert. Die enthaltende Expressionskassette mit dem gewünschten Gen, welches für das Protein MBP-IW codiert, wird anschließend über eine homologe Rekombination in das Genom von *K. lactis* integriert. Eine Selektion der Transformanten erfolgt über das ebenfalls in der Expressionskassette befindliche Gen *acetamidase* (*amdS*). Der Grund für die Verwendung des Protein Expression Kits war unter anderem, dass das gewünschte Protein sekretorisch transportiert und ins Zellmedium ausgeschleust wird. Dies bietet einen entscheidenden Vorteil bei der Proteinreinigung. Außerdem wurde der eukaryotische Organismus *K. lactis* verwendet, um mögliche Nachteile eines prokaryotischen Expressionssystems bei der Proteinexpression zu umgehen.

1.6 Zielstellung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen zur häufigsten Todesursache und es besteht demnach ein großer Behandlungsbedarf um dem entgegenzuwirken. Als einer der größten Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen gilt Bluthochdruck, daher sind präventive Maßnahmen von besonderem Interesse. Eine Vielzahl von bioaktiven Peptiden besitzen ACE-hemmende Eigenschaften, was sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte. Besonders potent in seiner ACE-hemmenden Wirkung ist das Dipeptid IW.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zu etablieren, um das ACE-hemmende Dipeptid IW im großen Maßstab herzustellen. Mit Hilfe von rekombinanten Proteinen sollte IW biotechnologisch hergestellt und auf sein ACE-hemmendes Potential im Vergleich zum chemisch synthetisierten IW getestet werden.

Da neben IW auch andere Peptide in der Literatur beschrieben wurden, welche ACE-hemmend wirken, sollten weitere Peptide aus Lebensmittelproteinen auf deren ACE-hemmendes Potential untersucht werden. Die beiden Pflanzenproteine Soja und Reis wurden im Vergleich zum tierischen Molkenprotein getestet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

100 x Acetamid Stock	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt
30 % Acrylamid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agar	Formedium Ltd., Hunstanton, UK
Agarose	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
APS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
AW	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz
Bacto Peptone	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bradykinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Calciumchlorid Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Carbogen	Linde AG Gases Division Germany, Pullach
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau R250	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
10 x Cut Smart Puffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Dansylchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
deionisiertes Wasser	hauseigenes entsalztes Wasser
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
d'NTP Mix (25 mM each)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
doppelt destilliertes Wasser	hauseigene Entsalzungsanlage von Weinert Wasser-technik GmbH, Dresden
DTT	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA, 0,5 M	Ambion Inc., Austin, USA
EDTA-Salz	Merck KGaA, Darmstadt

Essigsäure, 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol, absolut	VWR International GmbH, Dresden
Ethanol, 96 % vergällt	Berkel AHK Alkoholhandel GmbH & Co. KG, Berlin
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
EW	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz
Galaktose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Heparin	Rotexmedica GmbH Arzneimittelwerk, Trittau
Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz
IPTG	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	VWR International GmbH, Dresden
IW	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz
IW (D-Form)	peptides & elephants GmbH, Hennigsdorf
IY	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
LB Agar Difco™, Lennox	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
LB Medium, Lennox	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
6 x Loading Dye Solution	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
LW	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Maltose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol, HPLC-grade	VWR International GmbH, Dresden
Milchpulver, blotting grade	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydroxid Plätzchen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
nukleasefreies Wasser	Promega Corporation, Madison, USA
ortho-Phosphorsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Roti®-Blot A, Anodenpuffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Roti®-Blot K, Kathodenpuffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure, 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SDS-Pellets	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SOC-Medium	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Sorbitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Urethan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
VW	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz
VY	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz
W	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz
WL	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz
WW	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz
YCB Medium Powder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Yeast Transformation Reagent	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Zellkulturmedium, Customer Formulation – Endothelial Cell BM + 28 mM Hepes + Supplement Pack (Endothelial Cell GM) + 1 % Penicillin/Streptomycin	PromoCell GmbH, Heidelberg Life Technologies Inc., Carlsbad, USA

2.1.2 Enzyme

ACE aus der Kaninchenlunge	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas Typ II ≥ 40 Einheiten/mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>BsmI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

cComplete™ Proteaseinhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>EcoRI</i> -HF	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Faktor Xa (1000 µg/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase (2 Einheiten/µl) + Reaktionspuffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Quick T4 DNA Ligase + quick Ligation Reaktionspuffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
RNase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Sac II</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Taq DNA Polymerase (5 Einheiten/µl) + ThermoPol Puffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Thermolysin vom <i>Geobacillus stearothermophilus</i> Typ X 30-175 Einheiten/mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>XhoI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
<i>XmnI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Zymolyase	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege

2.1.3 Standards

GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
MBP 5 Protein (6 mg/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Quick-Load Purple 2-Log DNA Ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

2.1.4 Kits

BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
DNA Clean-up-Procedure JetQuick DNA Purification Kit	Genomed molekularbiologische und diagnostische Produkte GmbH, Löhne
Gelextraktion: GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Gelextraktion: JetQuick DNA Purification Kit	Genomed molekularbiologische und diagnostische Produkte GmbH, Löhne

<i>K. lactis</i> Protein Expression Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Midiprep Plasmidaufreinigung: JetStar 2.0 Plasmid Purification Kit	Genomed molekularbiologische und diagnostische Produkte GmbH, Löhne
Miniprep Plasmidaufreinigung: Jet Quick Spin Column Technique Kit	Genomed molekularbiologische und diagnostische Produkte GmbH, Löhne
pMAL Protein Fusion&Purification System	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

2.1.5 Mikroorganismen

BL21 Express kompetente <i>E. coli</i> Zellen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
DH5α kompetente <i>E. coli</i> Zellen	Invitrogen AG, Regensburg
<i>K. lactis</i> GG799 Zellen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

2.1.6 Plasmide

pMK-RQ	Life Technologies Inc., Carlsbad, USA
--------	---------------------------------------

2.1.7 Expressionsvektoren

pKLAC1- <i>malE</i> (Kontrollvektor)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
pKLAC2	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
pMAL-c5X	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

2.1.8 Oligonukleotide

folgende Primer	Invitrogen AG, Regensburg
K.I_pKLAC2_2_R	GGATCTTGCAGCACAGAACT
K.I_pKLAC2_3_R	ACGAACGGTTTGGATGGTTG
MALIW_pLAC_Eco_R	GCGCCATTATGAATTCTTACCAGATCCAGATGTA
MALIW_pLAC_Xho_F	ATAATCCTCGAGAAAAGAATGAAAATCGAAGAAGG TAAAC
MBP_IW_F	ATGAAGGTCTGGAAGCGGTT
MBP_IW_R	GCTTCGCAACGTTCAAATCC
Seqprimer 1_F	GCGGATAACAAGCTCAAC
Seqprimer 3_R	TCGGCACTAATAACCGTT

folgende Primer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Integration Primer 1	ACACACGTAAACGCGCTCGGT
Integration Primer 2	ATCATCCTTGTCAGCGAAAGC
Integration Primer 3	ACCTGAAGATAGAGCTTCTAA

2.1.9 Antikörper

primärer Antikörper:	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Anti-MBP Monoklonal	
sekundärer Antikörper:	Dianova GmbH, Hamburg
Goat anti-mouse IgG HRP	

2.1.10 Tiere

Wistar Ratten	Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich
---------------	--

2.1.11 hergestellte Puffer, Medien und Lösungen

Affinitätschromatographie-Elutionspuffer Säulenpuffer + 10 mM Maltose	360,32 mg Maltose ad. 100 ml Säulenpuffer steril filtrieren, entgasen
Affinitätschromatographie-Säulenpuffer 20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl	20 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,4 2 ml 0,5 M EDTA 11,7 g NaCl ad. 1 l ddH ₂ O steril filtrieren, entgasen
Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml)	1 g Ampicillin ad. 10 ml nukleasefreies Wasser steril filtrieren
Blockierpuffer für Western Blot 5 % Milchpulver in 1 x TBST	5 g Milchpulver 100 ml 1 x TBST
Blotpuffer A	100 ml Roti®-Blot A, Anodenpuffer 200 ml Methanol ad. 1 l ddH ₂ O
Blotpuffer K	100 ml Roti®-Blot K, Kathodenpuffer 200 ml Methanol ad. 1 l ddH ₂ O
Coomassie-Entfärbelösung	250 ml 96 % Ethanol, vergällt 80 ml 100 % Essigsäure ad. 1 l ddH ₂ O

Coomassie-Färbelösung	600 mg Coomassie Brilliant Blau R250 ad. 500 ml Fixierlösung erwärmen, durch Faltenfilter filtrieren
Coomassie-Fixierlösung	400 ml 96 % Ethanol, vergällt 100 ml 100 % Essigsäure ad. 1 l ddH ₂ O
Isolierlösung I, pH 8,0 900 mM Sorbitol, 100 mM Tris/HCl, 100 mM EDTA	32,79 g Sorbitol 2,42 g Tris 7,44 g EDTA-Salz ad. 150 ml ddH ₂ O pH mit HCl auf 8,0 einstellen ad. 200 ml ddH ₂ O
Isolierlösung II, pH 8,0 50 mM Tris/HCl, 20 mM EDTA	1,21 g Tris 1,49 g EDTA-Salz ad. 150 ml ddH ₂ O pH mit HCl auf 8,0 einstellen ad. 200 ml ddH ₂ O
Kanamycin-Stammlösung (25 mg/ml)	125 mg Kanamycinsulfat ad. 5 ml nukleasefreies Wasser steril filtrieren
LB-Agar (Lennox) + 100 µg/ml Amp	7 g LB-Agar (Lennox) ad. 200 ml deionisiertes Wasser autoklavieren 100 µg/ml Amp frisch zugeben
LB-Agar (Lennox) + 25 µg/ml Kan	7 g LB-Agar (Lennox) ad. 200 ml deionisiertes Wasser autoklavieren 25 µg/ml Kan frisch zugeben
LB-Medium (Lennox) + 100 µg/ml Amp	20 g LB-Medium (Lennox) ad. 1 l deionisiertes Wasser autoklavieren 100 µg/ml Amp frisch zugeben
LB-Medium (Lennox) + 25 µg/ml Kan	20 g LB-Medium (Lennox) ad. 1 l deionisiertes Wasser autoklavieren 25 µg/ml Kan frisch zugeben

LB-Medium (Lennox) + 0,2 % Glukose + 100 µg/ml Amp	20 g LB-Medium (Lennox) 2 g Glukose ad. 1 l deionisiertes Wasser autoklavieren 100 µg/ml Amp frisch zugeben
Lösung A, HPLC ddH ₂ O + 0,15 % H ₃ PO ₄	1 l ddH ₂ O 1,5 ml ortho-Phosphorsäure
Lösung B, HPLC Methanol + 0,15 % H ₃ PO ₄	1 l Methanol, HPLC grade 1,5 ml ortho-Phosphorsäure
PBS, pH 7,4 auch Superdex 16 60 200 pg Säulenpuffer (Größenausschlusschromatographie) 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄	8 g NaCl 200 mg KCl 1,4 g Na ₂ HPO ₄ 240 mg KH ₂ PO ₄ ad. 800 ml ddH ₂ O pH mit HCl auf 7,4 einstellen ad. 1 l ddH ₂ O autoklavieren
Phosphatpuffer, pH 7,2 - Superdex Peptide 10/300 GL Säulenpuffer (Größenausschlusschromatographie) 300 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2,7 mM KH ₂ PO ₄ , 8,28 mM Na ₂ HPO ₄	17,53 g NaCl 201,3 mg KCl 234,1 mg KH ₂ PO ₄ 1,18 g Na ₂ HPO ₄ ad. 1 l ddH ₂ O steril filtrieren, entgasen
PSS, pH 7,4 119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,17 mM MgSO ₄ , 1,18 mM KH ₂ PO ₄ , 25 mM NaHCO ₃ , 5,5 mM Glukose, 0,027 mM EDTA 2,5 mM CaCl ₂ *2H ₂ O	6,95 g NaCl 350 mg KCl 140 mg MgSO ₄ 160 mg KH ₂ PO ₄ 2,1 g NaHCO ₃ 990 mg D-Glukose 10 mg EDTA-Salz 20 min mit Carbogen begasen 370 mg CaCl ₂ *2H ₂ O ad. 1 l ddH ₂ O
2 x SDS-Ladepuffer	1 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8 4 ml 10 % SDS 3 ml Glycerol 5 mg Bromphenolblau ad. 10 ml ddH ₂ O

6 x SDS-Ladepuffer	3 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8 1g SDS Pellets 3 ml Glycerol 5 mg Bromphenolblau ad. 10 ml ddH ₂ O
10 x SDS-PAGE Laufpuffer	30 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS-Pellets ad. 1 l ddH ₂ O
SDS-PAGE Sammelgel 1,0 M Tris/HCl, pH 6,8	12,11 g Tris ad. 80 ml ddH ₂ O pH mit HCl auf 6,8 einstellen ad. 100 ml ddH ₂ O
SDS-PAGE Trenngel 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	36,34 g Tris ad. 170 ml ddH ₂ O pH mit HCl auf 8,8 einstellen ad. 200 ml ddH ₂ O
50 x TAE-Puffer	242 g Tris 57,1 ml 100 % Essigsäure 18,5 g EDTA-Salz ad. 1 l ddH ₂ O
10 x TBS-Puffer, pH 7,4	24,3 g Tris 175,3 g NaCl ad. 1,8 l ddH ₂ O pH mit HCl auf 7,4 einstellen ad. 2 l ddH ₂ O
1 x TBST-Puffer	100 ml 10 x TBS-Puffer 900 ml ddH ₂ O 1 ml Tween 20 (0,1 %)
TE-Puffer	1 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,0 200 µl 0,5 M EDTA ad. 100 ml ddH ₂ O autoklavieren, aliquotieren
1 M Tris/HCl, pH 7,0	60,57 g Tris ad. 460 ml deionisiertes Wasser pH mit HCl auf 7,0 einstellen ad. 500 ml deionisiertes Wasser

1 M Tris/HCl, pH 7,4	12,11 g Tris ad. 80 ml ddH ₂ O pH mit HCl auf 7,4 einstellen ad. 100 ml ddH ₂ O
YCB Agar + 5 mM Acetamid	15 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,0 5,85 g YCB Medium Powder 10 g Agar ad. 495 ml deionisiertes Wasser autoklavieren 5 ml 100 x Acetamid Stock steril zugeben
YPGal Medium	5 g Hefeextrakt 10 g Bacto Peptone ad. 475 ml deionisiertes Wasser autoklavieren 25 ml 40 % Galaktose steril dazugeben
YPGlu Medium	5 g Hefeextrakt 10 g Bacto Peptone ad. 475 ml deionisiertes Wasser autoklavieren 25 ml 40 % Glukose steril dazugeben
Zymolyaselösung	3 mg Zymolyase ad. 1 ml Isolierlösung I

2.1.12 Säulen für Proteinreinigung und Analyse

HiLoad 16/600 Superdex 200 pg	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
MBPTrap HP Säule 1 ml	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Superdex Peptid 10/300 GL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
XBidge RP18 Säule	Waters GmbH, Eschborn

2.1.13 Software und Online-Werkzeuge

Clone 4, Version 4.01	Scientific & Educational Software, Denver, USA
CodonCode Aligner	CodonCode Corporation, Centerville, USA
Empower 3	Waters GmbH, Eschborn
GraphPad Prism 6.05	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Origin® 2017	OriginLab Corporation, Northampton, USA
Primer3, Version 4.0.0	http://bioinfo.ut.ee/primer3/
UniProt	http://www.uniprot.org/

2.1.14 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Agarosegel-Elektrophoresekammer		Bio-Rad Laboratories GmbH, München
FPLC-System:	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg	
ÄKTA Explorer 10		
UV-Detektor: UV-9000		
Gefriertrocknungsanlage	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH,	
Alpha 1-2	Osterode	
Gene Flash Imaging System	Syngene Europe, Cambridge, UK	
HPLC-System:	Waters GmbH, Eschborn	
Waters Alliance 2695		
UV-Detektor: Waters 2487		
Fluoreszenz-Detektor: Waters 2475		
Imager, Fusion FX7	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen	
Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau	
Inkubator für Fermentation	New Brunswick Scientific, Edison, USA	
Mikroplatten-Reader CLARIOstar	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg	
NanoDrop® ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen	
Spektralphotometer		
Nitrozellulosemembran 0,45 µm	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg	
PCR-Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg	
pH-Elektrode	VWR International GmbH, Dresden	
pH-Messgerät ABL5	Radiometer GmbH, Krefeld	
SDS-Gelelektrophorese System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	
Semidry-Blot-System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	
Spritzenfilter (0,45 µm)	Corning Incorporated, New York, USA	
Ultraschallgerät Sonopuls HD70	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin	
Ultraschallgerät UP 100H	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow	
UV/Vis Spektrometer	Shimadzu, Kyōto, Japan	
UV mini 1240		
Vivaspin 20 Konzentratoren mit	Sartorius, Göttingen	
5 kDa cutoff-Membran		
Zellkulturinkubator, BBD 6220	Heraeus Holding GmbH, Hanau	

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Repetitive IW-Sequenz synthetisieren

Die DNA mit der repetitiven IW-Sequenz wurde nach folgender Vorgabe von der Firma Life Technologies synthetisiert:

RRIS**IWIW**KDQNVHY**IWIW**VTKPNEY**IWIW**KDQNVHY**IWIW**VTKPNEY**IWIW**KDQNVHY
IWIWVTKPNEY**IWIW**KDQNVHY**IWIW**

Die repetitive Sequenz beinhaltet 16-mal IW und hat eine Größe von 264 Basenpaaren (bp). Zwischen diesen einzelnen Dipeptiden wurden abwechselnd zwei verschiedene Spacer mit je sieben Aminosäuren eingebracht. Am 5' und 3' Ende der codierenden Sequenz wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *XmnI* (GAAGGATTC) und *EcoRI* (GAATTC) entworfen, um eine direkte Insertion in ein Vektor-System zu ermöglichen. Dieses repetitive DNA-Fragment wurde von Life Technologies in ein pMK-RQ Plasmid mit Kanamycin-Resistenz kloniert und lyophilisiert. Das lyophilisierte Plasmid (5 µg) wurde in 50 µl Trishydroxymethylaminomethan-EDTA (TE)-Puffer gelöst, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Design von Oligonukleotid-Primern

Es wurden verschiedene Oligonukleotide als Startermoleküle (Primer) für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), für die Klonierung und Sequenzierung hergestellt. Einige Primer wurden nach Angaben des *K. lactis* Protein Expression Kits für die Sequenzierung synthetisiert (Seqprimer 1_F, Seqprimer 2_F und Seqprimer 3_R). Andere Primer dienten zur Klonierung um bestimmte DNA-Abschnitte in die DNA einzubauen (MALIW_pLAC_Xho_F und MALIW_pLAC_Eco_R). Für die restlichen Primer wurden die jeweiligen Sequenzabschnitte aus der Software Clone 4 in das Online-Werkzeug Primer3 mit folgenden Parametern eingegeben: *Annealing*-Temperatur (Ta): 57-63 °C, Primergröße: 20-27 bp, GC-Gehalt: 40-70 %. Die Primer erhielten das Kürzel für einen Vorwärts (*Forward*; F)- oder Rückwärts (*Reverse*; R)-Primer. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind unter 2.1.8 aufgelistet.

2.2.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die PCR diente zur *in vitro*-Amplifikation der DNA unter Verwendung von geeigneten Primern. Die PCR-Produkte wurden für die Klonierung oder für die Sequenzierung verwendet. Falls eine Einführung von Restriktions- und Enzymschnittstellen in DNA-Abschnitte nötig war, wurden Primer mit den gewünschten zusätzlichen

Nukleotidsequenzen für die Klonierung verwendet. Die eingesetzten Primer wurden, wie bereits unter 2.2.2 beschrieben, für jedes Amplikon spezifisch entworfen. Im Folgenden wird der allgemeine Ablauf der PCR beschrieben, der immer gleich ist. Als erstes erfolgt eine initiale Denaturierung zur Aktivierung der Polymerasen. Anschließend folgten die Amplifikationszyklen der PCR. Ein Denaturierungsschritt diente dazu, die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufzutrennen. Es schloss sich eine Anlagerung der Primer (*Annealing*), unter optimalen Temperaturbedingungen dieser Primer, an die einzelsträngige DNA an. Die gewählte T_a war abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt der verwendeten Primer. Als nächstes erfolgte die Elongation durch die Polymerase bei deren Temperaturoptimum. Abschließend wurde eine finale Elongationsphase durchgeführt. Die Leerwertkontrolle bei der PCR erfolgte mit sterilem nukleasefreiem Wasser. Die PCR-Produkte wurden bis zur weiteren Verwendung kurzzeitig bei 4 °C und langfristig bei -20 °C gelagert. Das PCR-Programm und die jeweilige verwendete Polymerase zur Amplifikation der DNA werden in den entsprechenden Kapiteln im Detail beschrieben.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur Analyse oder zur Isolierung von DNA-Fragmenten. Es wurde eine horizontale, native Agarose-Gelelektrophorese mit verschiedenen Konzentrationen, je nach Größe des aufzutrennenden Fragments, verwendet. Hierfür wurde eine bestimmte Menge Agarose (1-1,5 %) abgewogen und mit 1 x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer gemischt. Das Gemisch wurde so lange erhitzt, bis sich die Agarose im Puffer komplett gelöst hatte. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Endkonzentration) wurde das Gel gegossen. Für analytische Agarosegele wurden die DNA-Proben mit 6 x Loading Dye Solution vermischt und 10 µl in die Taschen eines entsprechenden Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 100-120 V. Um die Fragmentgrößen charakterisieren zu können, wurden zusätzlich Längenstandards auf das Gel aufgetragen. Die Geldokumentation erfolgte mit dem Gene Flash Imaging System (Syngene Bio Imaging) unter UV-Licht. Für präparative Agarosegele wurden 50 µl der DNA-Probe (versetzt mit 6 x Loading Dye Solution) aufgetragen und analog der Bedingungen für analytische Gele aufgetrennt. Nach der Detektion der Banden wurden die gewünschten DNA-Fragmente mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und anschließend mit einem entsprechenden Kit für die Quantifizierung aufgereinigt.

2.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration nach der Präparation oder Aufreinigung aus dem Agarosegel wurde mit dem NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometer von PEQLAB durchgeführt. Hierbei handelte es sich um ein Micro-UV/Vis-Spektralphotometer, welches

zur Konzentrationsbestimmung von kleinen Volumina geeignet war. Für die Messung wurden je 2 µl der DNA von der Ausgangsprobe auf die Messfläche gegeben und die Absorption bei den Wellenlängen 230, 260 und 280 nm gemessen. Die Konzentrationsberechnung erfolgte auf der Grundlage, dass der Absorptionswert 1 bei der Wellenlänge von 260 nm einer DNA Konzentration von 50 µg/ml entsprach. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

2.2.6 Plasmid-Vervielfältigung

2.2.6.1 Transformation

Das pMK-RQ Plasmid mit der repetitiven IW-Sequenz (2.2.1) musste für weitere Experimente vervielfältigt werden. Hierfür wurden kompetente DH5α *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und 50 µl davon in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Zu den Bakterien wurden 20 ng des gelösten pMK-RQ Plasmids zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 30 s bei 42 °C im Wasserbad wurde das Reaktionsgefäß sofort wieder auf Eis überführt, 250 µl SOC-Medium (auf Raumtemperatur (RT)) dazugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl auf einer vorgewärmten Agarplatte (LB-Agar + 25 µg/ml Kanamycin (Kan)) ausplattiert. Als Negativkontrolle wurde eine Transformation ohne Plasmidzugabe durchgeführt und diese Probe ebenfalls wie beschrieben ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.6.2 Plasmidaufreinigung und Kontrollverdau

Zwei Klone (IW Klon 1, IW Klon 2) wurden von der Agarplatte (2.2.6.1) mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in je ein Röhrchen mit 5 ml LB-Medium + 25 µg/ml Kan überführt. Die Röhrchen wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert (Vorkultur). Von den Vorkulturen wurden je 1 ml in 100 ml LB-Medium + 25 µg/ml Kan gegeben, bei 37 °C inkubiert und bei einer optischen Dichte von 1,7 bei 600 nm (OD_{600}) geerntet. Mit den Kulturen wurde eine Midiprep Plasmidaufreinigung mit dem JetStar 2.0 Plasmid Purification Kit vorgenommen. Die Durchführung erfolgte, wie in der Produktanleitung beschrieben, mit folgenden Modifikationen: die Zellen wurden bei 5.000 x g für 10 min in 50 ml Reaktionsgefäßen pelletiert. Nach der Lyse und Präzipitation wurde das Lysat in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und laut Protokoll zentrifugiert. Nach Elution der DNA mit 5 ml Elutionspuffer und Zugabe von 3,5 ml Isopropanol wurde das Eluat von einem Klon auf 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und für 30 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Zum Waschen der DNA-Pellets wurde in jedes Reaktionsgefäß 500 µl 70 % Ethanol gegeben. Die DNA-Pellets wurden mit 20 µl autoklaviertem doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst und die

Resuspensionen von einer Ursprungskultur (IW Klon 1 oder IW Klon 2) wieder zusammen pipettiert.

Die Konzentration der DNA wurde am NanoDrop® gemessen (2.2.5) und es folgte ein Kontrollverdau von je 1 µg des gereinigten Plasmids mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*-HF und *XmnI* (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Reaktionsansatz beim Kontrollverdau von IW Klon 1 und IW Klon 2

Komponenten für 1 x Ansatz	IW Klon 1	IW Klon 2
Plasmid DNA	1,1 µl (1 µg)	1,3 µl (1µg)
10 x Cut Smart Puffer	2 µl	2 µl
<i>EcoRI</i> -HF (20 Einheiten/µl)	0,5 µl	0,5 µl
<i>XmnI</i> (20 Einheiten/µl)	0,5 µl	0,5 µl
nukleasefreies Wasser	15,9 µl	15,7 µl
Inkubation	1 h bei 37 °C	

Die Produkte des Verdau wurden für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert und mit einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt (2.2.4). Die Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinbestimmung

Für die Durchführung der enzymatischen Hydrolyse und für die Ausbeuteberechnung wurde eine Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte von den Proteinproben nach der Proteinreinigung, sowohl vor als auch nach der enzymatischen Hydrolyse (siehe 2.6.2), durchgeführt. Die Proteinquantifizierung erfolgte in einer Doppelbestimmung. Als Proteinstandard diente das mitgelieferte *bovine serum albumin* (BSA), welches mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) in aufsteigenden linearen Konzentrationen von 25 µg/ml bis 2000 µg/ml verdünnt wurde. Für die Proteinproben, die Standardreihe und den Leerwert (PBS) wurden je 25 µl in eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und das BCA-Reagenzgemisch laut Herstellerangaben hinzugefügt. Die Platte wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die Absorption mit dem Mikroplatten-Reader CLARIOStar bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über die lineare Regression der mitgeführten BSA-Standards.

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde durchgeführt, um die Proteinexpression sowie Proteinreinigung zu überprüfen. Es wurden SDS-Gele mit 10 %, 12 % oder 15 % Acrylamid nach Laemmli gegossen (Laemmli, 1970) (Zusammensetzung siehe Anhang, 8.1.3). Zu den Proteinproben wurde ein 2-fach bzw. 6-fach Natriumdodecylsulfat (SDS)-Ladepuffer sowie 20 mM Dithiothreitol (DTT) gegeben. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 95 °C gekocht, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Zur Größenbestimmung wurden 5 µl des Proteinstandards PageRuler™ Prestained Protein Ladder aufgetragen. Die Konzentrierung der Proteine erfolgte zunächst im Sammelgel bei 80 V. Nach Eintritt der Proteine in das Trenngel erfolgte die Auftrennung bei 120 V in 1 x Laufpuffer. Zur Analyse der Proteinbanden wurde das Gel über Nacht bei RT in Coomassie-Färbelösung gegeben und geschwenkt. Am nächsten Tag wurde das Gel mit Entfärberlösung entfärbt und die sichtbaren Proteinbanden mit Hilfe des Imager Fusion FX7 ausgewertet.

2.3.3 Western Blot

Bei der verwendeten Methode handelte es sich um ein Semidry-Blot-Verfahren. Die aufgetrennten Proteine aus der SDS-PAGE wurden beim Blotten auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Hierfür wurde ein 2-Puffer-System (Blotpuffer A und Blotpuffer K) verwendet. Die Gele wurden je nach Größe auf die Membran bei unterschiedlichen mA (Größe der Membran x 1,5) für 1,5 h geblottet. Die Membran wurde anschließend mit 1 x Tris-gepufferter Salzlösung mit 0,1 % Tween 20 (TBST) gewaschen und danach über Nacht mit Blockierpuffer (5 % Milchpulver in 1 x TBST) bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Im Anschluss daran wurde die Membran 3-mal für je 5 min mit 1 x TBST gewaschen und dann bei RT für 1 h mit dem primären Antikörper (Ak) inkubiert (Anti-MBP monoklonal, 1:30.000). Nach erneutem Waschen mit 1 x TBST (3-mal je 5 min) erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Ak für 30 min bei RT (Goat anti-mouse IgG *Horseradish peroxidase* (HRP), 1:40.000). Die verwendeten Ak wurden in 5 % Milchpulver mit 1 x TBST verdünnt. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift (3-mal 5 min mit 1 x TBST). Nach diesem konnte die Proteinexpression unter Verwendung von Chemilumineszenz (SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate) mit Hilfe des Imager Fusion FX7 detektiert werden.

2.4 Klonierung in *E. coli*

Für die Produktion des gewünschten IW-repetitiven Proteins in *E. coli* wurde das pMAL Protein Fusion&Purification System von New England Biolabs gewählt, welches gleichzeitig als Affinitätstag MBP für die Reinigung lieferte. Für nähere Erläuterungen des Expressions- und Reinigungsprinzips siehe Kapitel 1.5.4.1.

2.4.1 Verdau von Plasmid-DNA und Vektor mit Restriktionsenzymen und Aufreinigung

Für den Verdau wurden 10 µg vom gereinigten Plasmid (IW Klon 1; 2.2.6.2) und 5 µg vom Vektor pMAL-c5X eingesetzt und mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*-HF und *XmnI* verdaut (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Reaktionsansatz beim Verdau von IW Klon 1 und dem Vektor pMAL-c5X

Komponenten für 1 x Ansatz	IW Klon 1	Vektor pMAL-c5X
Plasmid DNA	11 µl (10 µg)	25 µl (5 µg)
10 x Cut Smart Puffer	5 µl	5 µl
<i>EcoRI</i> -HF (20 Einheiten/µl)	0,5 µl	0,5 µl
<i>XmnI</i> (20 Einheiten/µl)	0,5 µl	0,5 µl
nukleasefreies Wasser	33 µl	19 µl
Inkubation	37 °C über Nacht	

Die verdauten Proben wurden bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert und danach mit einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt (2.2.4). Die Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem Gelextraktionskit JetQuick DNA Purification, wie im Protokoll beschrieben, aufgereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl 68 °C warmem nukleasefreiem Wasser. Anschließend wurde eine Konzentrationsbestimmung am NanoDrop® durchgeführt (2.2.5) und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.2 Ligation der DNA

Das Zielfragment und der linearisierte Vektor pMAL-c5X (2.4.1) wurden mit dem Enzym Quick T4 DNA Ligase ligiert. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Zugabe des Inserts mitgeführt (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Reaktionsansatz bei der Ligation vom verdauten Insert IW Klon 1 mit dem Vektor pMAL-c5X bzw. dem Kontrollansatz

Komponenten für 1 x Ansatz	Probe	Kontrolle
DNA (Vektor pMAL-c5X)	2 µl (36,24 ng)	2 µl (36,24 ng)
DNA (Insert IW Klon 1)	1,9 µl (20,14 ng)	-
2 x quick Ligation Reaktionspuffer	10 µl	10 µl
Quick T4 DNA Ligase	1 µl	1 µl
nukleasefreies Wasser	6,1 µl	8 µl
Inkubation	10 min bei RT	

2.4.3 Transformation in *E. coli*

Nach der Ligation erfolgte die Transformation des rekombinanten Plasmids (pMAL-MBPIW) in die kompetenten BL21 Express *E. coli* Zellen. Diese Zellen wurden auf Eis aufgetaut und ein Aliquot von 50 µl für die Transformation eingesetzt. Zu diesen 50 µl wurden 2 µl des jeweiligen Ligationsansatzes (2.4.2) gegeben und nach 5-mal Schwenken für 30 min auf Eis inkubiert. Danach verweilte das Reaktionsgefäß ruhig für 20 s bei 42 °C und wurde anschließend wieder für 5 min auf Eis gestellt. Es wurden 200 µl SOC-Medium dazugegeben (bereits auf RT) und das Gefäß für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Der Ansatz sowie der Kontrollansatz (ohne Insert) wurden auf vorgewärmte LB Agarplatten + 100 µg/ml Amp ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4.4 Detektion positiver Klone

Von der Agarplatte mit dem Probenansatz wurden 20 Klone (Klon 1-20) mit sterilen Zahnstochern gepickt, auf eine Sicherungsplatte (LB-Agarplatte + 100 µg/ml Amp) gestrichen und der Zahnstocher anschließend in ein Röhrchen mit 4 ml LB-Medium + 100 µg/ml Amp gegeben. Die Platte und die Röhrchen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine DNA Miniprep zur Aufreinigung der Plasmid-DNA mit dem Kit Jet Quick Spin Column Technique laut Protokollangaben. Lediglich nach der Pelletresuspendierung wurde je Klon alles in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und nach Protokoll weiter verfahren. Die Elution erfolgte mit 50 µl 68 °C warmem nukleasefreiem Wasser, wobei vor der Zentrifugation eine Inkubation für 1 min bei RT erfolgte.

Mit der gewonnenen Plasmid DNA wurde von ausgewählten Klonen ein Kontrollverdau mit den Enzymen *EcoRI*-HF und *BsmI* vorgenommen (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: Reaktionsansatz beim Kontrollverdau der Klone 1 und 18-20

Komponenten für 1 x Ansatz	Klon 1, 18-20
Plasmid DNA	10 µl
10 x Cut Smart Puffer	2 µl
<i>EcoRI</i> -HF (20 Einheiten/µl)	1 µl
nukleasefreies Wasser	7 µl
Inkubation	30 min bei 37 °C
<i>BsmI</i> (20 Einheiten/µl)	1 µl
Inkubation	30 min bei 65 °C

Alle Produkte des Kontrollverdaus wurden mit einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt (2.2.4) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Klone 18 und 19 sollten sequenziert werden. Hierbei wurde überprüft, ob das Insert die richtige Position und Orientierung besaß. Die DNA-Konzentration aus der Miniprep wurde mit dem NanoDrop® gemessen (2.2.5) und die DNA mit nukleasefreiem Wasser auf 1 ng/µl verdünnt. Für die PCR zur Vervielfältigung des DNA-Abschnitts wurden die Primer MBP_IW_F und MBP_IW_R genutzt (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Reaktionsansatz der PCR mit 1 x Taq DNA Polymerase (25 µl Ansatz)

Komponenten für 1 x Ansatz	Klon 18 und 19
Plasmid DNA (1ng/µl)	1 µl
10 x ThermoPol Puffer	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Polymerase (5 Einheiten/µl)	0,125 µl
Primer F (10 µM)	0,5 µl
Primer R (10 µM)	0,5 µl
nukleasefreies Wasser	19,88 µl

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

95 °C	30 s	} 32 x
95 °C	20 s	
60 °C	30 s	
68 °C	60 s	
68 °C	5 min	
10 °C	∞	

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5 %iges Agarosegel zur Analyse aufgetragen (2.2.4) und die Sequenzierung der DNA von den Klonen 18 und 19 wurde von der Arbeitsgruppe DNA Sequencing am Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden durchgeführt. Dafür wurden je Klon 220-230 ng und je 10 µM vom Primer MBP_IW_R eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte bei 58 °C und die Sequenzen wurden mit der Software CodonCode Aligner ausgewertet. Die weiteren Versuche wurden mit dem Klon 18 durchgeführt, welcher nachfolgend als pMALIW K18 bezeichnet wird.

2.5 Kultivierung und Expression mit *E. coli*

2.5.1 Lagerung der positiven Klone

Von dem Klon pMALIW K18 wurde eine Glycerolstammlösung für die Lagerung hergestellt. Hierfür wurde der Klon mit einem sterilen Zahnstocher von der Sicherungsplatte gepickt, eine Kultur (100 ml Kolben) mit 20 ml LB-Medium + 0,2 % Glukose + 100 µg/ml Amp damit angeimpft und über Nacht im Inkubationsschüttler bei 30 °C und 150 rpm inkubiert. In 10 Kryokonservierungsröhrchen wurden 300 µl autoklaviertes Glycerol gefüllt und je Röhrchen 600 µl aus der Kultur dazugegeben. Nach einer Durchmischung wurden die Glycerolstammlösungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Optimierung der Proteinproduktion des löslichen MBP-IW mit dem Klon pMALIW K18

Es wurden unterschiedliche Wachstumsbedingungen zur Optimierung der Expression des löslichen Proteins MBP-IW geprüft. Als Parameter wurden verschiedene IPTG-Konzentrationen für die Induktion (0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM IPTG), Temperaturen während der Inkubation (25 °C, 30 °C und 37 °C) sowie unterschiedliche Wachstumszeitpunkte nach der Induktion getestet. Die Kulturen (LB-Medium + 0,2 % Glukose + 100 µg/ml Amp) wurden mit der Glycerolstammlösung des Klons pMALIW K18 angeimpft und bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 mit IPTG induziert. Nach der Induktion wurden zu bestimmten Zeitpunkten (1 h, 2 h und 3 h bei 37 °C Inkubation; 4 h, 6 h, 21 h, 28 h und 48 h bei 30 °C und 25 °C Inkubation) die OD₆₀₀ gemessen, eine Probe entnommen (welche auf OD₆₀₀ 1 normiert wurde) und 5 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µL Affinitätschromatographie-Säulenpuffer + cOmplete™ Proteaseinhibitor Cocktail (eine Tablette pro 25 ml Säulenpuffer) resuspendiert und auf Eis mittels Ultraschall aufgeschlossen (4 x 10 s, mit jeweils 10 s Pause). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 12.000 x g und 4 °C. Der Überstand wurde mit 6 x SDS-Ladepuffer und 20 mM

DTT versetzt (lösliches Protein) und das Pellet in 400 µl Affinitätschromatographie-Säulenpuffer + cOmplete™ Proteaseinhibitor Cocktail gelöst, 100 µl entnommen und ebenfalls mit 6 x SDS-Ladepuffer und 20 mM DTT versetzt (unlösliches Protein). Alle Proben wurden für 10 min bei 95 °C gekocht und anschließend mit SDS-PAGE analysiert (2.3.2).

2.5.3 Proteinproduktion mit dem Klon pMALIW K18

Nach Optimierungen der Wachstumsbedingungen und des Aufschlusses der Pellets wurde die Produktion vom rekombinanten MBP-IW-Konstrukt wie folgt durchgeführt. Es wurden zwei Vorkulturen (500 ml Kolben) mit jeweils 100 ml LB-Medium + 0,2 % Glukose + 100 µg/ml Amp mit der Glycerolstammlösung (pMALIW K18, 2.5.1) angeimpft und die Kolben im Inkubationsschüttler bei 37 °C und 150 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 4,5-5,0 inkubiert. Die beiden Vorkulturen wurden vereint und die OD₆₀₀ nochmals gemessen. Mit dieser vereinten Vorkultur wurden sechs Hauptkulturen in 2 l Kolben mit jeweils 500 ml LB-Medium + 0,2 % Glukose + 100 µg/ml Amp angezogen. Die Hauptkulturen wurden dafür mit einer OD₆₀₀ von 0,3 aus der Vorkultur angeimpft. Alle Kolben wurden bei 30 °C und 150 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 inkubiert. Die Kulturen wurden mit 0,1 mM IPTG induziert und nach 7-8 h bei 25 °C und 150 rpm geerntet. Hierfür mussten diese nacheinander auf Zentrifugenbecher verteilt und bei 4.000 x g für 10 min (4 °C) zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen, in die Becher erneut Kultur gegeben und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, bis die gesamte Biomasse isoliert wurde. Die Pellets (drei Stück je durchgeführter Biomasseproduktion) wurden gewogen und bis zur weiteren Verwendung der Proteinreinigung bei -20 °C gelagert.

2.6 Proteinreinigung von MBP-IW aus *E. coli* und Isolation vom rekombinanten IW

2.6.1 Proteinreinigung

2.6.1.1 Zellaufschluss

Die Zellen der Biomasseproduktion (2.5.3) wurden auf Eis aufgetaut und pro 1 g Pellet mit 5 ml Affinitätschromatographie-Säulenpuffer + cOmplete™ Proteaseinhibitor Cocktail (eine Tablette pro 25 ml Säulenpuffer) resuspendiert. Zusätzlich wurden 10 µg/ml RNase und 5 µg/ml DNase zugegeben und alles für 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und mit flüssigem Stickstoff gefroren. Zum Auftauen wurde das Röhrchen in ein Eisbad gegeben. Der Zellaufschluss erfolgte mit Ultraschall auf

Eis. Die Probe wurde 15 x für je 10 s geschallt (Sonopuls HD70, Power MS72ID, Cycle % zwischen 90 und kontinuierlich) mit je 10 s Pauseintervallen. Anschließend wurde das Röhrchen für 30 min bei 20.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand diente als Probe für die anschließende Proteinreinigung der löslichen Proteine. Das Pellet wurde in 25 ml Affinitätschromatographie-Säulenpuffer resuspendiert. Hiervon wurden 200 µl Probe entnommen, mit 6 x SDS-Ladepuffer und 20 mM DTT versetzt und für 10 min bei 95 °C gekocht.

2.6.1.2 Reinigung über Affinitätschromatographie

Der Überstand aus dem Zellaufschluss (2.6.1.1) wurde 6-fach mit Affinitätschromatographie-Säulenpuffer verdünnt und durch einen Spritzenfilter (0,45 µm) steril filtriert. Der verdünnte Überstand wurde auf die Säule geladen und der Durchfluss gesammelt (davon wurden 200 µl mit 6 x SDS-Ladepuffer und 20 mM DTT versetzt, Denaturierung: 10 min 95 °C). Anschließend folgte ein Waschschrift über 10 Säulenvolumen (SV), von dem ebenfalls analog eine Probe genommen und behandelt wurde. Die Elutionsfraktionen (20 µl je Fraktion wurden mit 4 µl 6 x SDS-Ladepuffer sowie 20 mM DTT versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert) und die anderen Proben wurden einzeln mittels SDS-PAGE analysiert (2.3.2) und bis zum nächsten Reinigungsschritt bei 4 °C gelagert.

System:	FPLC (<i>fast protein liquid chromatography</i>)-System ÄKTA Explorer 10
Detektion:	UV: 220 und 280 nm
Säule:	1 ml MBPTrap HP
Säulentemperatur:	4 °C
Einspritzvolumen:	90 µl
Fließmittel:	Säulenpuffer: 20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl
Flussrate:	0,5 ml/min
Elutionssystem:	Säulenpuffer + 10 mM Maltose; Gradient: 1 SV von 0 % auf 100 %, 10 SV bei 100 %
Elutionsvolumen:	500 µl je Fraktion

Regeneration der Säule

Zuerst wurde die Säule mit 10 SV Affinitätschromatographie-Säulenpuffer gespült. Anschließend folgten 3-5 SV ddH₂O und 5 SV 0,5 M NaOH. Danach wurde die Säule wieder mit 5-10 SV ddH₂O gespült und zum Schluss auf 20 % Ethanol gebracht und bei

4 °C gelagert. Die Regeneration der Säule wurde nach jedem Reinigungsschritt durchgeführt.

2.6.1.3 Reinigung über Größenausschlusschromatographie

Nach Analyse der Fraktionen vom ersten Reinigungsschritt mit Affinitätschromatographie wurden die 11 Fraktionen, welche das meiste Protein enthielten (etwa 5,5 ml), gepoolt. Von dem Pool wurden 60 µl entnommen (für SDS-PAGE), der Rest mit Hilfe einer 5 ml Injektionsschleife injiziert und gereinigt. Von den Elutionsfraktionen wurden, für die SDS-PAGE (2.3.2), je 20 µl mit 4 µL 6 x SDS-Ladepuffer sowie 20 mM DTT versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung wurden die Fraktionen bei 4 °C gelagert.

System:	FPLC-System ÄKTA Explorer 10
Detektion:	UV: 220 und 280 nm
Säule:	HiLoad 16/600 Superdex 200 pg
Säulentemperatur:	4 °C
Einspritzvolumen:	5,5 ml
Fließmittel:	PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Flussrate:	1 ml/min
Elutionssystem:	isokratisch; 1,5 SV
Elutionsvolumen:	750 µl je Fraktion

Regeneration der Säule

Nach jedem Reinigungsschritt wurde die Säule mit 2-3 SV ddH₂O gespült. Es folgte ein Waschschrift mit 1 M NaOH für 3 SV. Danach wurde die Säule wieder auf ddH₂O gebracht (2 SV), abschließend mit 2,5 SV 20 % Ethanol gespült und bei 4 °C gelagert.

2.6.2 Hydrolyse von MBP-IW und Isolation des rekombinanten IW

2.6.2.1 Konzentrierung

Die Fraktionen nach dem ersten oder zweiten Reinigungsschritt, welche die größte Menge des Proteins MBP-IW enthielten, wurden gepoolt. Von der gepoolten Probe wurden 60 µl für die Proteinbestimmung (2.3.1), zur Konzentrationsbestimmung von MBP-IW vor der Konzentrierung, abgenommen. Vor der enzymatischen Hydrolyse musste die Probe konzentriert werden. Hierfür wurden die Vivaspin 20 Konzentratoren mit 5 kDa cutoff-

Membran verwendet. In das Röhrchen wurden 15 ml PBS gegeben und bei 4.700 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert (Waschschritt der Membran). Der Rest wurde verworfen und anschließend die Probe hineingegeben. Je nach Menge der Probe erfolgte eine Konzentrierung für 30-50 min bei 4.700 x g und 4 °C, bis ein Restvolumen der Probe von 1,5-2 ml erreicht wurde.

2.6.2.2 Hydrolyse von MBP-IW

Um die enzymatische Hydrolyse zu starten, erfolgte zuerst eine Proteinbestimmung von der konzentrierten Probe (siehe 2.3.1). Die Konzentration von MBP-IW wurde ebenfalls für die spätere Ausbeuteberechnung genutzt. Die Hydrolyse wurde in zwei verschiedenen Ansätzen als einstufiger Enzymverdau mit α -Chymotrypsin oder als zweistufiger Enzymverdau mit α -Chymotrypsin und Thermolysin durchgeführt (Tabelle 2.6). Nach der Inkubation wurde das Hydrolysat bei -20 °C gelagert. Es erfolgte eine Lyophilisierung mittels Gefriertrocknung und die Probe wurde bei RT bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Tabelle 2.6: Reaktionsansatz der enzymatischen Hydrolyse von MBP-IW

Hydrolyse der konzentrierten Probe	einstufiger Enzymverdau	zweistufiger Enzymverdau
pH-Einstellung mit NaOH	7,5-8,0	7,5-8,0
Zugabe von α -Chymotrypsin	1:100 Enzym-Protein-Verhältnis (E-P-V)	
Inkubation	24 h bei 37 °C	16 h bei 37 °C
pH-Einstellung mit NaOH		7,8-8,2
Zugabe von Thermolysin		1:100 E-P-V
Inkubation		7 h bei 70 °C

2.6.2.3 Isolation vom rekombinanten IW über Größenausschlusschromatographie

Nach der Hydrolyse der Probe musste das rekombinante IW (rIW) von den restlichen Bestandteilen separiert werden. Dafür wurde eine erneute Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Als Säule wurde die Superdex Peptid 10/300 GL verwendet, welche einen optimalen Trennbereich von Molekülen mit einer relativen Molekülmasse von 100-7000 hat. Es wurden zuerst 50 μ l eines Gemisches aus den fünf Standards Albumin Fraktion V (66.000 Da), Bradykinin (1.060,22 Da), IW (317,39 Da), VY (280,32 Da) und W (204,23 Da) mit einer jeweiligen Konzentration von 100 μ M vor der eigentlichen Probe zur Identifikation der Retentionszeit von IW unter den nachfolgenden Bedingungen aufgetrennt.

Die hydrolisierte und lyophilisierte Probe (2.6.2.2) wurde in 450 µl Phosphatpuffer gelöst. Es wurden je Lauf 50 µl injiziert, die Elutionsfraktionen wurden gesammelt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

System:	FPLC-System ÄKTA Explorer 10
Detektion:	UV: 220 und 280 nm
Säule:	Superdex Peptid 10/300 GL
Säulentemperatur:	4 °C
Einspritzvolumen:	50 µl
Fließmittel:	Phosphatpuffer: 300 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2,7 mM KH ₂ PO ₄ , 8,28 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,2
Flussrate:	0,5 ml/min
Elutionssystem:	isokratisch; 1,8 SV
Elutionsvolumen:	500 µl je Fraktion

Regeneration der Säule

Nach jedem Reinigungsschritt erfolgte eine Regeneration der Säule (Details unter 2.6.1.3). Bei dieser Säule wurde lediglich 0,5 M NaOH anstatt 1 M NaOH verwendet.

2.6.2.4 Reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

Die Elutionsfraktionen (2.6.2.3) wurden aufgetaut und für 10 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Von jeder Fraktion wurden 40 µl in das HPLC-System unter folgenden Bedingungen injiziert.

System:	HPLC-System Waters Alliance 2695
Detektion:	UV: 228 und 280 nm
Säule:	XBridge RP18 Säule (5 µm, 4,6 x 150 mm)
Säulentemperatur:	RT
Einspritzvolumen:	40 µl
Fließmittel:	Lösung A: ddH ₂ O + 0,15 % H ₃ PO ₄ und Lösung B: Methanol + 0,15 % H ₃ PO ₄
Flussrate:	0,75 ml/min
Elutionssystem:	Gradient: 3 zu 35 % Lösung B in 27 min, 35 zu 97 % Lösung B in den nächsten 5 min, 97 zu 3 % Lösung B in den folgenden 5 min, Re-equilibration erfolgte für 2 min bei 3 % Lösung B

Die Auswertung wurde mit der Software Empower 3 durchgeführt.

2.7 Analytik von rIW

Fraktionen aus allen Reinigungsansätzen der Proteinexpression mittels *E. coli* mit einer rIW Reinheit $\geq 96\%$ (bestimmt in 2.6.2.4) wurden gepoolt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Anschließend wurde diese Probe lyophilisiert und in 1 ml ddH₂O gelöst.

2.7.1 RP-HPLC

Die gepoolte Probe wurde nochmals mit RP-HPLC und UV-Detektion bei 228 nm, 280 nm und den gleichen Fließmitteln wie unter 2.6.2.4 mit folgenden Abweichungen überprüft:

Einspritzvolumen: 20 μl

Flussrate: 1 ml/min

Elutionssystem: Gradient: 3 zu 56 % Lösung B in 9 min, 56 zu 97 % Lösung B in den nächsten 3 min, 97 zu 3 % Lösung B in den folgenden 5 min. Die Re-equilibration erfolgte für 3 min bei 3 % Lösung B

2.7.2 Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)

Die gepoolte Probe wurde zusätzlich mit der LC-ESI-MS/MS analysiert. Diese Analyse wurde von Frau Dr. Hagemann vom Institut für Lebensmittelchemie der TU Dresden nach folgenden Angaben durchgeführt (Kaiser et al., 2016).

2.7.3 Identifizierung der N-terminalen Aminosäure im Dipeptid

Um die N-terminale Aminosäure zweifelsfrei als Isoleucin bestimmen zu können, wurden rIW und als Kontrolle das chemisch produzierte kommerziell erwerbliche L-IW (cIW) sowie das chemisch produzierte kommerziell erwerbliche D-IW (cDIW) mit Dansylchlorid derivatisiert (Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Reaktionsansatz bei der Derivatisierung der N-terminalen Aminosäure

Komponenten	rIW, cIW bzw. cDIW
Peptidprobe (10 μM)	50 μl
Na ₂ CO ₃ Puffer (80 mM)	50 μl
Dansylchlorid (15 mg/10 ml Aceton)	50 μl
Inkubation	90 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$

Nach N-terminaler Anlagerung des Dansylchlorids (Doppelbestimmung) wurden die Proben nach der Inkubation bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Die Proben wurden vor der Messung für 10 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert, mit RP-HPLC und Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 506 \text{ nm}$) unter den gleichen Konditionen wie unter 2.7.1 beschrieben analysiert.

2.8 Klonierung in *K. lactis*

Für die Produktion des gewünschten IW-repetitiven Proteins wurde ein weiteres Expressionssystem getestet, um dieses in das Hefegenom *K. lactis* mit Hilfe des Protein Expression Kits von New England Biolabs einzubringen. Als Ausgang für die Klonierung wurde der DNA-Abschnitt des IW-Konstrukts mit Affinitätstag MBP, welcher im Rahmen der Experimente mit *E. coli* generiert wurde (siehe 2.4), verwendet.

2.8.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten und Aufreinigung

Der DNA-Abschnitt des repetitiven IW-Konstrukts mit Affinitätstag MBP, welcher in *E. coli* generiert wurde, sollte mittels PCR amplifiziert werden. Für die Versuche mit dem *K. lactis* Expression Kit musste vor das Fusionsprotein (MBP-IW) eine weitere Restriktions-schnittstelle für das Enzym *Xho*I (CTCGAG) und eine Schnittstelle für die Kex Protease (AAAAGA) eingebracht werden, damit das Gen in den richtigen Leserahmen einkloniert und das Protein später ins Medium ausgeschleust werden konnte. Aus diesem Grund wurden Primer mit den gewünschten zusätzlichen Nukleotidsequenzen hergestellt (MALIW_pLAC_Xho_F und MALIW_pLAC_Eco_R) und bei der folgenden PCR verwendet. Als Ausgangsmaterial für die PCR diente die DNA vom Klon pMALIW K18 von der Klonierung mit *E. coli* (siehe Kapitel 2.4). Für eine hohe DNA-Ausbeute wurde die PCR für den Klon 4-mal mit je 50 µl angesetzt (Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8: Reaktionsansatz der PCR mit 1 x Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (50 µl Ansatz)

Komponenten für 1 x Ansatz	pMALIW K18
DNA pMALIW K18 (1ng/µl)	1 µl
5 x Q5 Puffer	10 µl
d’NTP (10 mM)	1 µl
Polymerase (2 Einheiten/µl)	0,5 µl
Primer F (10 µM)	2,5 µl
Primer R (10 µM)	2,5 µl
nukleasefreies Wasser	32,5 µl

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

98 °C	30 s	
98 °C	10 s	} 10 x
59 °C	30 s	
72 °C	45 s	
98 °C	10 s	} 20 x
70 °C	30 s	
72 °C	45 s	
72 °C	2 min	
10 °C	∞	

Die PCR-Produkte wurden mit einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt (2.2.4), die Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und laut Protokoll mit dem GeneJet Gel Extraction Kit aufgereinigt. Die DNA wurde mit 30 µl Elutionspuffer eluiert, jedoch wurde vor der finalen Zentrifugation der Puffer für 1 min auf der Säule belassen. Von den vier Ansätzen wurden je zwei zusammengeführt (pMALIW K18_1 und pMALIW K18_2). Es erfolgte eine Konzentrationsbestimmung am NanoDrop® (2.2.5) und die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.8.2 Verdau von Plasmid-DNA und PCR-Fragment mit Restriktionsenzymen und Aufreinigung

Vom Plasmid pKLAC2 wurden 5 µg und von den amplifizierten und gereinigten PCR-Produkten wurden 2 µg (pMALIW K18_1 und pMALIW K18_2, siehe 2.8.1) mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*-HF und *XhoI* verdaut (Tabelle 2.9).

Tabelle 2.9: Reaktionsansatz beim Verdau der PCR-Produkte pMALIW K18_1 und pMALIW K18_2 sowie des Vektors pKLAC2

Komponenten für 1 x Ansatz	pMALIW K18_1	pMALIW K18_2	Vektor pKLAC2
DNA	14,8 µl (2 µg)	13,6 µl (2 µg)	5 µl (5 µg)
10 x Cut Smart Puffer	5 µl	5 µl	2 µl
<i>EcoRI</i> -HF (20 Einheiten/µl)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
<i>XhoI</i> (20 Einheiten/µl)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
nukleasefreies Wasser	29,2 µl	30,4 µl	12 µl
Inkubation	2 h bei 37 °C		

Die verdauten Proben wurden bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert und anschließend auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen (2.2.4). Die Aufreinigung aus dem Gel erfolgte wie unter 2.8.1 beschrieben. Mit der DNA wurde eine Konzentrationsbestimmung am NanoDrop® (2.2.5) durchgeführt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.8.3 Ligation der DNA

Das Zielfragment wurde mit dem linearisierten Vektor (2.8.2) mit Hilfe des Enzyms Quick T4 DNA Ligase ligiert (Tabelle 2.10). Es wurde eine Kontrolle ohne Zugabe der Inserts mitgeführt.

Tabelle 2.10: Reaktionsansatz bei der Ligation der verdauten Inserts pMALIW K18_1 und pMALIW K18_2 mit dem Vektor pLAC2

Komponenten für 1 x Ansatz	Probe 1	Probe 2
	pMALIW K18_1	pMALIW K18_2
DNA (Vektor pLAC2)	1,1 µl (52 ng)	1,1 µl (52 ng)
DNA (Insert pMALIW K18)	4,5 µl (156 ng)	3 µl (158 ng)
2 x quick Ligation Reaktionspuffer	10 µl	10 µl
Quick T4 DNA Ligase	1 µl	1 µl
nukleasefreies Wasser	4,4 µl	5,9 µl
Inkubation	10 min bei RT	

2.8.4 Transformation

Nach der Ligation erfolgte die Transformation der rekombinanten Plasmide in die kompetenten BL21 Express *E. coli* Zellen. Diese wurde wie bereits unter 2.4.3 beschrieben durchgeführt. Hier wurde jedoch lediglich 1 µl der verschiedenen Ligationsansätze (pMALIW K18_1, pMALIW K18_2 und Kontrolle ohne Insert) zu den Zellen gegeben.

2.8.5 Detektion positiver Klone

Die Detektion der positiven Klone erfolgte wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben. Von den Agarplatten mit den Proben pMALIW K18_1 und pMALIW K18_2 wurden jeweils zehn Klone gepickt, gesichert und Kulturen für die DNA Miniprep angesetzt. Nach der DNA Miniprep zur Aufreinigung der Plasmid DNA mit dem Kit Jet Quick Spin Column Technique wurde ein Kontrollverdau mit der Plasmid-DNA und den Enzymen *EcoRI*-HF und *XhoI* durchgeführt (Tabelle 2.11).

Tabelle 2.11: Reaktionsansatz bei dem Kontrollverdau der Klone 1-20

Komponenten für 1 x Ansatz	Klon 1-20
Plasmid DNA	5 µl
10 x Cut Smart Puffer	2 µl
<i>EcoRI</i> -HF (20 Einheiten/µl)	0,5 µl
<i>XhoI</i> (20 Einheiten/µl)	0,5 µl
nukleasefreies Wasser	12 µl
Inkubation	2 h bei 37 °C

Die Produkte wurden nach dem Verdau zur Analyse auf ein 1,0 %iges Agarosegel aufgetragen (2.2.4) und eine Konzentrationsbestimmung am NanoDrop® durchgeführt (2.2.5). Die DNA von drei Klonen (Klon 2, 9 und 10) wurde von der Arbeitsgruppe DNA Sequencing am Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden sequenziert. Dafür wurden je Klon 550-575 ng und je 10 µM vom Primer MBP_IW_F eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte bei 58 °C und die Sequenzen wurden mit der Software CodonCode Aligner ausgewertet.

2.8.6 Linearisierung von pKLAC2-MBPIW K10 sowie pKLAC1-*malE* und Integration in *K. lactis*

Vom generierten Plasmid vom Klon 10 (2.8.5), welcher im Weiteren als pKLAC2-MBPIW K10 bezeichnet wird und dem Kontrollplasmid pKLAC1-*malE* wurden 2 µg eingesetzt und mit dem Enzym *SacII* linearisiert (Tabelle 2.12).

Tabelle 2.12: Reaktionsansatz bei der Linearisierung des Plasmids pKLAC2-MBPIW K10 und des Kontrollplasmids pKLAC1-*malE*

Komponenten für 1 x Ansatz	pKLAC2-MBPIW K10	pKLAC1- <i>malE</i>
Plasmid DNA	5,8 µl (2 µg)	2 µl (2 µg)
10 x Cut Smart Puffer	5 µl	5 µl
<i>SacII</i> (20 Einheiten/µl)	1 µl	1 µl
nukleasefreies Wasser	38,2 µl	42 µl
Inkubation	2 h bei 37 °C	

Nach der Linearisierung erfolgte eine Reinigung der DNA, um störende Puffer- oder Enzymrückstände von der DNA zu entfernen. Die Aufreinigung wurde mit der DNA Clean-up-Procedure des Kits JetQuick DNA Purification nach Protokollangaben durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl 68 °C warmem nukleasefreiem Wasser und dieses wurde

vor der Zentrifugation für 1 min inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration am NanoDrop® gemessen (2.2.5) und die Proben bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Innerhalb des linearisierten Bereichs (Expressionskassette) befindet sich das Zielgen und das Gen *amdS* für die Selektion sowie die Bereiche vom 3' Ende und dem 5' Beginn des P_{LAC4} Promotors. Dieser Bereich wurde über eine homologe Rekombination direkt in die Promotorregion des LAC4 Lokus des Hefegenoms integriert. Somit ist *K. lactis* in der Lage, das gewünschte Protein zu exprimieren.

Von den linearisierten Vektoren wurden etwa 680-750 ng für die homologe Rekombination in den *K. lactis* GG799 Zellen eingesetzt. Es wurden zwei Reaktionsgefäße mit den Zellen auf Eis aufgetaut und in jedes Gefäß 620 µl Yeast Transformation Reagent gegeben und bis zur Homogenität geschwenkt. Der linearisierte Vektor (pKLAC2-MBPIW K10 bzw. pKLAC1-*malE*) wurde in je ein Gefäß gegeben, vorsichtig gemischt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Mischungen für 1 h bei 37 °C ins Wasserbad gestellt. Die Zellen wurden bei 3.000 x g für 2 min pelletiert und das Pellet in 1 ml YPGlu-Medium resuspendiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Die Ansätze wurden für 4 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert bevor die Zellen erneut pelletiert wurden. Die in 1 ml PBS resuspendierten Pellets wurden auf YCB Agarplatten + 5 mM Acetamid ausplattiert und bei 30 °C inkubiert.

Von der Platte des Kontrollansatzes pKLAC1-*malE* wurden zehn Klone mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und auf eine Sicherungsplatte (YCB-Agar + 5 mM Acetamid) als Patch ausgestrichen. Von der Probe pKLAC2-MBPIW K10 wurde mit 20 verschiedenen Klonen gleich verfahren. Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert.

2.8.7 Identifizierung der Klone, deren Expressionskassette in das Genom von *K. lactis* integriert wurde

Eine 1 M Sorbitollösung (1 ml) wurde mit einer Pipettenspitze Zymolyasepulver versetzt. Von jedem zu prüfenden Patch (2.8.6) wurde mit einer sterilen Pipettenspitze etwas von der Agarplatte gekratzt und in 25 µl Sorbitol-Zymolyase-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation für 1 h bei 30 °C wurden die Proben für 10 min bei 98 °C lysiert. Es folgten zwei verschiedene PCR-Ansätze mit den gepickten Klonen (20 von der Probe pKLAC2-MBPIW K10 und 3 von der Kontrolle pKLAC1-*malE*, siehe 2.8.6), um zu prüfen, ob die Expressionskassette einmal (PCR mit Integration Primer 1 und 2) oder mehrfach (PCR mit Integration Primer 2 und 3) in das Genom von *K. lactis* integriert wurde (Tabelle 2.13).

Tabelle 2.13: Reaktionsansatz der PCR mit 1 x Taq DNA Polymerase (25 µl Ansatz)

Komponenten für 1 x Ansatz	pKLAC2-MBPIW K10 Klon 1-20; pKLAC1- <i>malE</i> Klon 4-5,13
DNA	6,25 µl
10 x ThermoPol Puffer	2,5 µl
dNTP (2 mM)	2,5 µl
Polymerase (5 Einheiten/µl)	0,25 µl
Primer F (10 x)	2,5 µl
Primer R (10 x)	2,5 µl
nukleasefreies Wasser	8,5 µl

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

94 °C	30 s	} 31 x
50 °C	30 s	
72 °C	3 min	
72 °C	10 min	
10 °C	∞	

Die PCR-Produkte wurden auf 1,0 %ige Agarosegele zur Analyse aufgetragen (2.2.4).

2.8.8 Genomische DNA isolieren und sequenzieren

Nach den ersten Überprüfungen sollte von dem Klon pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8 nach der Integration in das *K. lactis*-Genom eine umfangreiche Sequenzierung vorgenommen werden. Hierfür musste die genomische DNA von dem Klon isoliert werden. In ein 50 ml Reaktionsgefäß wurden 5 ml YPGal-Medium sowie etwas von der Glycerolstammlösung (2.9.1) gegeben und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, für 5 min bei 3.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 545 µl Isolierlösung I resuspendiert. Es wurden 5 µl Zymolyaselösung und 50 µl 0,28 M β-Mercaptoethanol zugegeben, gut gemischt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 3.000 x g für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 500 µl Isolierlösung II resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 50 µl 10 % SDS zugegeben, gut gemischt und für 20 min bei 65 °C inkubiert. Das Lysat wurde mit 200 µl 5 M Kaliumacetat zur Neutralisierung erneut gut gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Der entstandene Niederschlag wurde für 3 min bei 13.000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurde 1 ml 98 % Ethanol

zugegeben und für 10 min bei -20 °C gelagert. Die Sedimentation der Nukleinsäuren erfolgte bei 14.000 x g für 5 min. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde für 5 min unter Vakuum bei RT getrocknet und in 300 µl TE-Puffer resuspendiert, 10 µl 1 mg/ml RNase zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde die DNA gefällt. Das DNA-Pellet wurde mittels Zentrifugation gewonnen (13.000 x g, 20 min), mit 70 % Ethanol gewaschen und das Pellet unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen und die Konzentration am NanoDrop® gemessen (2.2.5). Anschließend wurde die DNA mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und vier verschiedene PCR-Ansätze durchgeführt, um den Klon zu sequenzieren. Der Reaktionsansatz war analog zum Ansatz in Tabelle 2.8. Als DNA wurde hier jeweils 1 µl mit 6,6 ng des Klons pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8 eingesetzt.

PCR I: Integration Primer 1 und Integration Primer 2, ~ 2650 bp, 66 °C

PCR II: Seqprimer 1_F und Seqprimer 3_R, ~ 1900 bp, 61 °C

PCR III: Integration Primer 3 und K.I_pKLAC2_2_R, ~ 3400 bp, 60 °C

PCR IV: Integration Primer 3 und Integration Primer 2, ~ 2580 bp, 60 °C

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

98 °C	30 s	} 32 x
98 °C	10 s	
60-66 °C	30 s	
72 °C	90 s	
72 °C	2 min	
10 °C	∞	

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,0 %iges Agarosegel aufgetragen (2.2.4), die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem GeneJet Gel Extraction Kit, wie im Protokoll beschrieben, aufgereinigt. Der optionale Schritt 6 wurde ebenfalls durchgeführt, da die DNA für die Sequenzierung verwendet werden sollte. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl Elutionspuffer und vor der finalen Zentrifugation wurde der Puffer für 1 min auf der Säule belassen. Anschließend wurde eine Konzentrationsbestimmung am NanoDrop® vorgenommen (2.2.5).

Die Sequenzierung mit der DNA wurde von der Arbeitsgruppe DNA Sequencing am Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden durchgeführt. Hierfür wurde von dem Produkt aus PCR I 40,38 ng DNA und 10 µM vom Primer K.I_pKLAC2_2_R (61 °C) eingesetzt. Für das Produkt aus PCR II erfolgte die Sequenzierung mit je 35,08 ng

DNA und je 10 μ M der folgenden Primer: Seqprimer 1_F (54 °C), Seqprimer 3_R (52 °C) und K.I_pKLAC2_3_R (60 °C). Vom Produkt aus PCR III wurde 44,28 ng DNA und 10 μ M des Primers K.I_pKLAC2_2_R (61 °C) verwendet. Zur Sequenzierung der DNA aus der PCR IV wurden je 31,11 ng und je 10 μ M der Primer Integration Primer 2 (62 °C) und Integration Primer 3 (58 °C) eingesetzt. Die Sequenzen wurden mit der Software CodonCode Aligner ausgewertet.

2.9 Kultivierung und Expression mit *K. lactis*

2.9.1 Lagerung der positiven Klone

Von den Klonen pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8 sowie pKLAC1-*malE* Klon 5 wurden Glycerolstammlösungen zur Lagerung hergestellt. Hierfür wurde der jeweilige Klon mit einem sterilen Zahnstocher von der Sicherungsplatte gepickt und eine Kultur mit 5 ml YPGal Medium angeimpft (in einem 50 ml Reaktionsgefäß). Diese Kulturen wurden über Nacht bei 30 °C im Inkubationsschüttler bei 150 rpm inkubiert. In vier Kryokonservierungsröhrchen pro Klon wurden je 500 μ l autoklaviertes 40 %iges Glycerol gefüllt und je Röhrchen 500 μ l aus der entsprechenden Kultur dazugegeben. Die Glycerolstammlösungen wurden gut durchmischt, im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.9.2 Optimierung der Proteinproduktion mit dem Klon pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8

Der optimale Zeitpunkt der Proteinexpression und Ausschleusung von MBP-IW ins Medium sollte ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde eine größere Menge von der Glycerolstammlösung (pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8, 2.9.1) in 5 ml YPGal Medium (im 50 ml Reaktionsgefäß) gegeben und über Nacht bei 30 °C bei 150 rpm inkubiert (erste Vorkultur). Für die zweite Vorkultur wurden 20 ml YPGal Medium + die 5 ml der ersten Vorkultur in einen 100 ml Kolben gegeben und für weitere 8 h bei 30 °C im Inkubationsschüttler geschüttelt. Die Hauptkultur (100 ml YPGal Medium im 500 ml Kolben) wurde mit der zweiten Vorkultur so angeimpft, dass die Hauptkultur eine OD₆₀₀ von 0,3 hatte und wurde bei 30 °C weiter inkubiert. Nach 16 h, 24 h, 40 h, 48 h, 64 h, 72 h und 88 h wurde die OD₆₀₀ überprüft, jeweils 2 ml entnommen und für 10 min bei 5.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Mit dem Überstand (4 x 200 μ l) wurde eine Methanol-Chloroform-Fällung (2.9.3) durchgeführt, bevor die Proben mittels SDS-PAGE analysiert wurden (2.3.2).

2.9.3 Methanol-Chloroform-Fällung

Zur Konzentrierung der Proteine im Überstand wurde eine Methanol-Chloroform-Fällung durchgeführt (modifiziert nach Wessel & Flügge, 1984). Als Ausgangsmaterial dienten 200 µl vom Überstand einer Hefekultur, welcher mit 800 µl Methanol (vorgekühlt) sowie 200 µl Chloroform (vorgekühlt) versetzt wurde. Nach einer kräftigen Durchmischung wurden 600 µl ddH₂O zugegeben und der Ansatz wieder kräftig gemischt. Es folgte eine Zentrifugation bei 12.000 x g für 20 min (4 °C). Anschließend wurde die obere Phase abgenommen und verworfen, ohne die Interphase zu beschädigen (enthält Proteine) und 600 µl Methanol zu dem Ansatz gegeben. Nach einer kräftigen Durchmischung erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 12.000 x g für 15 min (4 °C). Die Reaktionsgefäße wurden geleert und das Pellet luftgetrocknet, bevor es in 25 µl ddH₂O resuspendiert, mit 6 µl 6 x SDS-Ladepuffer + 20 mM DTT versetzt und die Proben für 10 min bei 95 °C denaturiert wurden. Diese Proben wurden je nach Versuch zur Analyse mit SDS-PAGE und Western Blot verwendet (2.3.2, 2.3.3).

2.9.4 Proteinproduktion mit dem Klon pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8

Nach Optimierung der Wachstumsbedingungen wurde die Produktion vom rekombinanten Protein MBP-IW wie folgt durchgeführt. Die Hauptkultur wurde mit dem pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8 (aus der Glycerolstammlösung, 2.9.1), wie unter 2.9.2 beschrieben, hergestellt. Nach 64 h wurde die OD₆₀₀ überprüft und die Kultur geerntet. Hierfür wurde die Kultur auf zwei 50 ml Reaktionsgefäße verteilt und zentrifugiert (15 min bei 5.000 x g, 4 °C). Die Überstände wurden bis zur Proteinreinigung bei 4 °C gelagert.

2.10 Proteinreinigung von MBP-IW aus *K. lactis*

2.10.1 Reinigung über Affinitätschromatographie

Nach 64 h Wachstum wurde der Überstand der Zellernte (2.9.4) durch einen Spritzenfilter (0,45 µm) steril filtriert und auf die 1 ml MBPTrap HP Säule geladen. Das Programm des Laufs wurde analog zur Reinigung von MBP-IW aus *E. coli* durchgeführt (2.6.1.2). Vom Auftrag, Durchfluss, Waschschrift und den Elutionsfraktionen wurden je 200 µl Probe entnommen und eine Methanol-Chloroform-Fällung (2.9.3) durchgeführt, bevor diese mittels SDS-PAGE analysiert (2.3.2) und bei 4 °C gelagert wurden.

2.10.2 Parameterprüfung

Für eine Optimierung der Bindung von MBP-IW aus *K. lactis* an die MBPTrap HP Säule bei der Reinigung über die Affinitätschromatographie wurden verschiedene Parameter getestet.

Der pH des Fermentationsmediums (YPGal), welches bei der Proteinexpression mit *K. lactis* zum Einsatz kam, wurde bei 37 °C und 15 °C mit dem pH-Messgerät ABL5 gemessen.

Zusätzlich wurde eine neue Kultur aus der Glycerolstammlösung (pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8) hergestellt (100 ml YPGal Medium als Hauptkultur, siehe 2.9.2). Nach 64 h wurde die OD₆₀₀ überprüft und die Kultur geerntet (Kultur auf zwei 50 ml Reaktionsgefäße verteilt und für 15 min bei 5.000 x g und 4 °C zentrifugiert). Die Überstände wurden über Nacht bei -20 °C eingefroren, anschließend gefriergetrocknet und in 62 ml Affinitätschromatographie-Säulenpuffer resuspendiert. Die Probe wurde durch einen Spritzenfilter (0,45 µm) steril filtriert und wie unter 2.6.1.2 beschrieben auf die 1 ml MBPTrap HP Säule geladen und die Proben zur Analyse vorbereitet (2.10.1).

Zudem sollte eine Reinigung von MBP, welches vom Kontrollplasmid pKLAC1-*malE* produziert und in das Genom von *K. lactis* eingebracht wurde, mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Als Ausgangsmaterial für die Kultur diente der Klon pKLAC1-*malE* Klon 5. Dieser wurde wie beschrieben kultiviert (2.9.4) und der Überstand unter den gleichen Bedingungen wie der von pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8 gereinigt und die Proben analysiert (2.10.1).

Des Weiteren wurden verschiedene Kulturen (100 ml YPGal Medium als Hauptkultur, siehe 2.9.2) angesetzt. Dabei handelte es sich um Kulturen von den GG799 *K. lactis* Zellen, dem leeren pKLAC2 Vektor (ohne Insert), dem pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8 und dem pKLAC1-*malE* Vektor als Kontrolle. Alle Kulturen wurden bei 30 °C inkubiert und nach 48 h jeweils eine Probe entnommen. Die Überstände wurden konzentriert (2.9.3) und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (2.3.2, 2.3.3), um eine vergleichende Aussage über die Proteinexpression von MBP-IW im System mit *K. lactis* treffen zu können.

2.11 Bestimmung des ACE-hemmenden Potentials (ACE-Assay)

2.11.1 Herstellung der Peptidmixe

Vom Molke-, Soja- und Reisprotein wurde eine Hydrolyse mit den Enzymen α -Chymotrypsin und Thermolysin durchgeführt. Diese Hydrolyse sowie die anschließende Identifizierung und Quantifizierung von bioaktiven Dipeptiden in diesen Hydrolysaten wurde von Frau Steffi Rudolph vom Institut für Lebensmittelchemie der TU Dresden durchgeführt. Die Peptidmixe wurden, basierend auf der Zusammensetzung der identifizierten und quantifizierten bioaktiven tryptophan- und tyrosinhaltigen Dipeptide der Hydrolysate von Molke-, Soja- und Reisprotein, hergestellt (Tabelle 2.14). Die Dipeptide wurden in PBS gelöst und basierend auf der Konzentration jedes Dipeptids ($\mu\text{mol pro g Hydrolysat/l}$) ein Peptidmix mit maximal 4 g Hydrolysat/l hergestellt. Diese wurden bis zu ihrer Nutzung für die ACE-Aktivitätsassays bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 2.14: Zusammensetzung der bioaktiven tryptophan- und tyrosinhaltigen Dipeptide der Hydrolysate vom Molke-, Soja- und Reisprotein

Dipeptid	$\mu\text{mol Dipeptid in 1 g Hydrolysat/l}$		
	Molke	Soja	Reis
AW		35	36
EW		17	9
IW	253	24	12
LW		154	41
VW		20	38
WL	48	13	26
WW		12	14
IY		115	61
VY	121	62	176
bioaktive Peptide gesamt	422	452	413

2.11.2 Prinzip der Bestimmung des ACE-hemmenden Potentials

Die Bestimmung der ACE-Aktivität wurde modifiziert nach Cushman und Cheung durchgeführt (Cushman & Cheung, 1971). Das ACE katalysierte hierbei die Hydrolyse vom Substrat Hip-HL zu L-Histidyl-L-Leucin und N-Benzoyl-glycin (Hippursäure) (Abbildung 2.1). Die Hippursäure kann mittels RP-HPLC quantifiziert ($\lambda_{\text{max}} = 228\text{ nm}$) werden. Durch die Zugabe eines Inhibitors wird entsprechend weniger Hippursäure gebildet. Dadurch kann über eine Konzentrationsreihe des jeweiligen Inhibitors die Konzentration ermittelt werden,

die notwendig ist, um die ACE-Enzymaktivität um 50 % zu hemmen (IC_{50} -Wert). Als Blindwert für jeden Assay diene PBS und entsprach einer 100 %igen ACE-Aktivität.

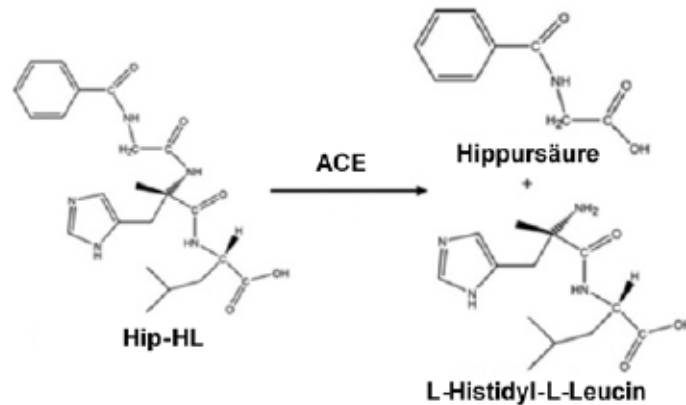


Abbildung 2.1: Prinzip des ACE-Assays mit dem Substrat Hip-HL und dessen Hydrolyse zu Hippursäure und L-Histidyl-L-Leucin durch ACE (modifiziert nach Ahmad et al., 2017)

In den verschiedenen Assays wurde das Dipeptid rIW auf sein ACE-hemmendes Potential im Vergleich zu den Dipeptiden cIW und cDIW getestet. Des Weiteren wurden die drei Peptidmixe vom Molke-, Soja- und Reisprotein untersucht.

2.11.3 Hemmpotential von rIW und den Peptidmischen an ACE aus der Kaninchenlunge

Die Bestimmung der ACE-Aktivität isoliert aus der Kaninchenlunge wurde wie unter 2.11.2 beschrieben durchgeführt. Die Konzentrationen für die Bestimmung des IC_{50} -Wertes der Dipeptide waren 0,21 bis 20,3 μM ($n = 3$) und für die Peptidmixe 1,18 bis 235,29 mg/l ($n = 3$) im Assay (Tabelle 2.15). Das ACE wurde als lyophilisiertes Pulver mit PBS gelöst (Aktivität im Assay 0,025 U/ml (für die Peptidmixe) bzw. 0,05 U/ml (für die Dipeptide)), der Assay wie in Tabelle 2.16 realisiert und die enzymatische Reaktion mit 0,33 M HCl abgestoppt. Die Proben wurden bis zur Messung mittels RP-HPLC bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.15: Verwendete Konzentrationen zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes

Konzentrationen zur Bestimmung des IC ₅₀ -Wertes	
Dipeptide [μ M]	Peptidmixture [mg/l]
0,21	1,18
0,63	2,35
1,3	5,88
2,5	11,76
5,1	23,53
10,1	47,06
13,5	117,65
20,3	235,29

Tabelle 2.16: Reaktionsansatz des ACE-Assays mit ACE aus Kaninchenlunge

	Dipeptide	Peptidmixture
5 mM Hip-HL	65 μ l	130 μ l
Probe oder PBS (Blindwert)	10 μ l	10 μ l
ACE	15 μ l	30 μ l
Inkubation	1 h bei 37 °C	
0,33 M HCl	95 μ l	190 μ l

2.11.4 Hemmpotential von rIW und den Peptidmixturen an ACE aus humanem Plasma

Blutproben (20 ml), welche für die Messung der ACE-Aktivität dienten, wurden von gesunden Freiwilligen durch Punktion der Vene entnommen (Erlaubnis wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden erteilt, EK 299082014). Diese wurden in Citrat-Monovetten entnommen und bei 1.500 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Plasma wurde aliquotiert (1 ml) und bis zum Aktivitätsassay bei -20 °C gelagert. Für die Bestimmung der IC₅₀-Werte wurden bei den verschiedenen Dipeptiden Konzentrationen von 5,1 bis 20,3 μ M (n = 3) und bei den Peptidmixturen Konzentrationen von 11,76 bis 235,29 mg/l (n = 3-8) (Tabelle 2.17) im Assay verwendet (Tabelle 2.18). Die enzymatische Reaktion wurde mit 0,33 M HCl gestoppt und die Proben bis zur Messung mit der RP-HPLC bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.17: Verwendete Konzentrationen zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes

Konzentrationen zur Bestimmung des IC ₅₀ -Wertes	
Dipeptide [μ M]	Peptidmixe [mg/l]
5,1	11,76
10,1	23,53
13,5	58,83
20,3	117,65
	156,86
	235,29

Tabelle 2.18: Reaktionsansatz des ACE-Assays mit ACE aus humanem Plasma

	Dipeptide	Peptidmixe
5 mM Hip-HL	50 μ l	100 μ l
Probe oder PBS (Blindwert)	10 μ l	10 μ l
ACE	30 μ l	60 μ l
Inkubation	30 min bei 37 °C	
0,33 M HCl	95 μ l	190 μ l

2.11.5 Hemmpotential von rIW und den Peptidmixin an ACE aus Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

HUVECs wurden, wie zuvor beschrieben (Thom et al., 2013), isoliert und kultiviert. Die Erlaubnis zur Verwendung von Nabelschnüren zur Isolierung von HUVECs wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden erteilt (Erlaubnis EK 203112005). Die HUVECs wurden für den Assay mit den Dipeptiden in 48-Well-Mikrotiterplatten bzw. für den Assay mit den Peptidmixin in 12-Well-Mikrotiterplatten ausgesät (Zellwachstumsfläche etwa 0,95 cm² bzw. 3,8 cm² pro Well), welche zuvor mit 0,5 % Gelatine für mindestens 1 h bei RT beschichtet wurden. Die Zellen wuchsen im Zellkulturmedium in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Für die Bestimmung der ACE-Aktivität und der daraus resultierenden Berechnung des IC₅₀-Wertes wurden für die Dipeptide Konzentrationen von 2,15 bis 125 μ M (n = 3) und für die Peptidmixe in jedes Well Konzentrationen von 10 bis 1000 mg/l (n = 3-7) gegeben (Tabelle 2.19). Alle Lösungen für den Assay waren auf 37 °C vorgewärmt. Nach der Inkubation (45 min bei 37 °C) wurden von jeder Probe 200 μ l Überstand entnommen und die enzymatische Reaktion durch Erhitzen auf 95 °C für 7 min gestoppt (Tabelle 2.20). Die

Proben wurden bis zur Messung mit der RP-HPLC bei -20 °C gelagert. Für jede Platte mit kultivierten HUVECs wurden Zellen von einer Nabelschnur verwendet und jede Platte beinhaltete drei Blindwerte (Kontrolle ohne Inhibitor).

Tabelle 2.19: Verwendete Konzentrationen zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes

Konzentrationen zur Bestimmung des IC ₅₀ -Wertes	
Dipeptide [μ M]	Peptidmixe [mg/l]
2,15	10
5	14,3
10	20
15	50
25	100
50	200
125	500
	1000

Tabelle 2.20: Reaktionsansatz des ACE-Assays mit ACE aus HUVECs

	Dipeptide IW	Peptidmixe
4 mM Hip-HL	200 μ l	1,5 ml
Probe oder PBS (Blindwert)	200 μ l	1,5 ml
ACE	ACE von HUVECs	
	48-Well	12-Well
Inkubation	45 min bei 37 °C	
Abstoppen	7 min bei 95 °C	

2.11.6 Hemmpotential von den Peptidmixin an ACE aus Aortenringen von Ratten

Es wurden zehn 12 Wochen alte männliche Wistar Ratten für die Studie verwendet. Die Verfahren wurden von den örtlichen Behörden der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden genehmigt (AZ 24-9168.24-1/2012-16) und waren im Einklang mit den gültigen EU-Vorschriften. Die Ratten wurden mit Urethan (1,9 g/kg KG; intraperitoneal) narkotisiert. Um ein Verklumpen des Blutes zu verhindern wurde den Tieren Heparin (1 ml, 5000 IU/ml; intraperitoneal) verabreicht. Nach Abwesenheit der Schwanz-, Ohr- und Augenreflexe wurde die thorakale Aorta isoliert, welche sofort in kalte physiologische Salzlösung (PSS) gegeben wurde. Die Aorta wurde in 2 mm bzw. 2,5 mm große Aortenringe geschnitten und für den ACE-Aktivitätsassay

verwendet. Für die Messung der ACE-Aktivität in diesen Ringen wurden 12-Well-Mikrotiterplatten genutzt. In jedes Well wurde ein Aortenring gegeben (2 mm bzw. 2,5 mm) und im Assay Konzentrationen für die Peptidmixe von 20 bis 1000 mg/l ($n = 5$) eingesetzt (Tabelle 2.21). Nach der Inkubation (30 min bei 37 °C) wurde von jeder Probe 1 ml Überstand entnommen und die enzymatische Reaktion bei 95 °C für 7 min gestoppt (Tabelle 2.22). Die Proben wurden bis zur Messung mit der RP-HPLC bei -20 °C gelagert. Die Aortenringe wurden bei -80 °C gelagert, anschließend lyophilisiert und gewogen, um ein exaktes Trockengewicht von jedem Aortenring bestimmen zu können.

Tabelle 2.21: Verwendete Konzentrationen zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes

Konzentrationen zur Bestimmung des IC ₅₀ -Wertes	
Peptidmixe [mg/l]	
	20
	50
	100
	200
	500
	1000

Tabelle 2.22: Reaktionsansatz des ACE-Assays mit ACE aus der Rattenaorta

	Peptidmixe
4 mM Hip-HL	1 ml
Probe oder PBS (Blindwert)	1 ml
ACE	ACE von Rattenaorta
Inkubation	30 min bei 37 °C
Abstoppen	7 min bei 95 °C

2.11.7 Bestimmung der ACE-Aktivität mit RP-HPLC

Zur Bestimmung des ACE-hemmenden Potentials der einzelnen Assays wurde mittels RP-HPLC das Produkt Hippursäure quantifiziert. Die Proben von den verschiedenen Assays (2.11.3-2.11.6) wurden aufgetaut und für 10 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Von den Proben des ACE-Assays wurden je 20 µl in das beschriebene HPLC-System injiziert und bei 228 nm und 280 nm gemessen. Für die Bestimmung der ACE-Aktivität der Peptidmixe wurde das Programm mit einem Fluss von 0,75 ml/min verwendet (2.6.2.4). Die Analyse der IW-Proben erfolgte mit einem Fluss von 1 ml/min und dem unter 2.7.1 beschriebenen Programm.

2.12 Statistische Auswertung

Die IC_{50} -Werte wurden berechnet, indem die ACE-Aktivität (y-Achse) gegen die Inhibitorkonzentration (x-Achse) aufgetragen und eine Modellanpassung nach der Bayes'schen Datenanalyse durchgeführt wurde (von der Linden et al., 2014). Das Modell

$$f(x) = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^b}$$

wurde an die experimentellen Daten angepasst, wobei die Aktivität f als Funktion der Inhibitorkonzentration x angegeben wird. Hierbei ist f eine Sigmoidalfunktion, welche von drei gefitteten Parametern abhängig ist (a , IC_{50} , b). Bei einer geringen Inhibitorkonzentration $x \ll IC_{50}$, ist f gleich dem Parameter a . Die angepasste Funktion f verkleinert sich bei größeren Inhibitorkonzentrationen und nimmt den Wert von $f = a/2$ an, wenn $x = IC_{50}$. Bei sehr hohen Inhibitorkonzentrationen ($x \gg IC_{50}$) nähert sich die Funktion f einem Wert von 0 an. Die Steilheit des Funktionsanstieges in der Nähe vom IC_{50} wird durch den Parameter b modifiziert. Eine Gaußsche Normalverteilung beschreibt hierbei die Beziehung zwischen experimentellen Daten und dem Modell (von der Linden et al., 2014). Darüber hinaus wurde die Messunsicherheit der experimentellen Daten mit vier Freiheitsgraden berücksichtigt. Die numerische Umsetzung der Bayes'schen Datenanalyse erfolgte durch einen mehrfach geschachtelten Stichprobenalgorithmus (Skilling, 2006; Feroz & Hobson, 2008). Somit ermöglicht diese Analyse eine zuverlässige Schätzung der Parameter und deren Unsicherheiten sowie Konfidenzintervalle der angepassten Funktion.

Die Konzentrationen für die verschiedenen IWs und Peptidmixe, welche für die Berechnung des IC_{50} -Wertes gemessen wurden, waren abhängig vom jeweiligen ACE-System (2.11.3 - 2.11.6). Für die Dipeptide wurden diese mit $n = 3$ und für die Peptidmixe mit $n = 3-8$ bestimmt. Der IC_{50} -Wert ist als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Das ACE-hemmende Potential in den Aortenringen der Ratten wurde unter Berücksichtigung des Gewichts jedes einzelnen Rings berechnet.

Mögliche signifikante Unterschiede zwischen den IC_{50} -Werten wurden mit einer *one-way ANOVA*, gefolgt von einem Tukey Test, mit der Software GraphPad Prism 6.05 bestimmt. Ein Wert von $P \leq 0,05$ wurde als signifikanter Unterschied angesehen. Die grafische Darstellung erfolgte ebenfalls mit diesem Programm.

3 Ergebnisse

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Plasmid-Vervielfältigung

Zur Vervielfältigung des Plasmids pMK-RQ, mit der repetitiven IW-Sequenz, wurde dieses in kompetente DH5 α *E. coli* Zellen transformiert und auf einer Agarplatte ausplattiert. Von zwei Klonen (IW Klon 1 und IW Klon 2) wurde eine Midiprep Plasmidaufreinigung durchgeführt (2.2.6.2).

Die DNA-Konzentration der gereinigten DNA für IW Klon 1 war mit 912,67 ng/ μ l und für IW Klon 2 mit 775,17 ng/ μ l in einem ähnlichen Bereich.

Nach dem Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*-HF und *XmnI* zeigte sich bei beiden Klonen nach der Analyse eine Bande bei 264 bp (Pfeil) im Agarosegel (Abbildung 3.1), welche dem Erwartungswert entsprach. Für die weiteren Klonierungsarbeiten mit *E. coli* wurde der IW Klon 1 verwendet.

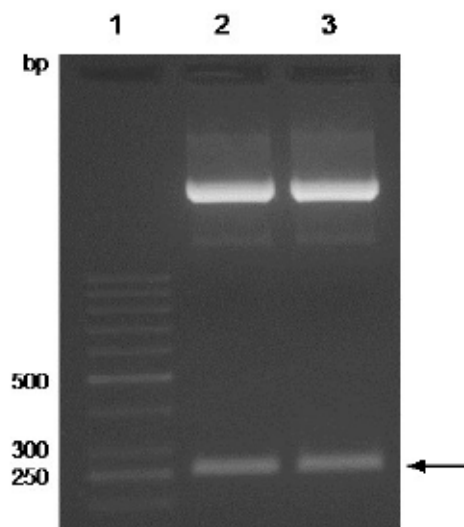


Abbildung 3.1: Elektrophoretische Auftrennung mittels 1,5 % Agarosegel zur Kontrolle des Verdaus von IW Klon 1 und IW Klon 2 mit *EcoRI*-HF und *XmnI*; Bahn 1: GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, Bahn 2: Verdau IW Klon 1, Bahn 3: Verdau IW Klon 2; Pfeil markiert die Bande des Produkts nach dem Kontrollverdau mit *EcoRI*-HF und *XmnI*

3.2 Klonierung in *E. coli*

3.2.1 Verdau von Plasmid-DNA und Vektor mit Restriktionsenzymen und Aufreinigung

Zur Integration der repetitiven IW-Sequenz (enthalten im Plasmid von IW Klon 1) in den Expressionsvektor pMAL-c5X mussten beide Plasmide mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*-HF und *XmnI* verdaut werden (2.4.1). Die Produkte wurden im Agarosegel analysiert und die entsprechende Bande aus diesem ausgeschnitten und aufgereinigt.

Die DNA-Konzentration für die aus dem Agarosegel gereinigte 264 bp große repetitive DNA-Sequenz von IW Klon 1 war 10,60 ng/µl. Die DNA des linearisierten Vektors (ohne MCS zwischen *EcoRI*-HF und *XmnI*) hatte nach dem Verdau und der Aufreinigung eine Konzentration von 18,12 ng/µl.

3.2.2 Detektion positiver Klone

Das verdaute Zielfragment vom IW Klon 1 wurde mit dem linearisierten Vektor mit Hilfe des Enzyms Ligase ligiert. Der neu generierte Vektor mit der repetitiven DNA-Sequenz wurde in kompetente *E. coli* Zellen transformiert und es erfolgte anschließend eine Detektion der positiven Klone.

Durch eine Sequenzierung ausgewählter Klone (Klon 18 und 19) sollte das Vorliegen von MBP-IW verifiziert werden. Um diesen DNA-Abschnitt sequenzieren zu können, musste mit den Primern eine PCR zur Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnitts durchgeführt werden. Die Anlagerung der Primer MBP_IW_F und MBP_IW_R wurde so gewählt, dass diese außerhalb des repetitiven IW-Abschnitts im 5' und 3' Bereich in der DNA des Expressionsvektors erfolgte. Demnach wurde die IW-Sequenz vollständig von dem 698 bp großen Sequenzbereich zwischen den beiden Primern erfasst.

Die PCR-Produkte wurden mit einem Agarosegel analysiert und die Klone 18 und 19 zeigten in den Bahnen 1 und 2 (Abbildung 3.2) die erwartete Bande knapp unterhalb von 700 bp (Pfeil). Der Vektor pMAL-c5X ohne die repetitive IW-Sequenz als Insert wies erwartungsgemäß keine Bande in diesem Bereich auf (Bahn 3), sondern eine Bande bei etwa 500 bp (Abbildung 3.2).

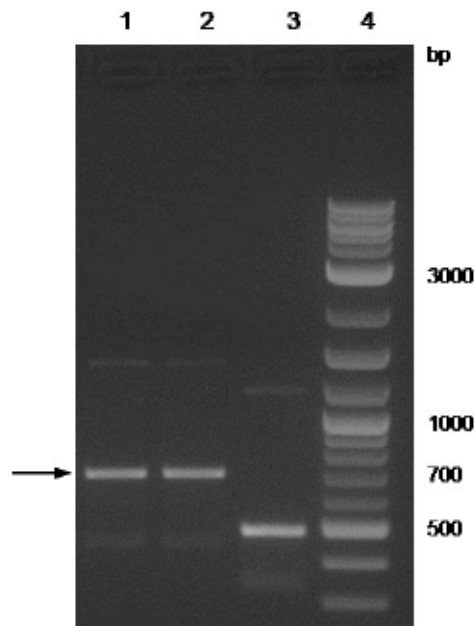


Abbildung 3.2: Elektrophoretische Auftrennung mittels 1,5 % Agarosegel mit den PCR-Produkten der Klone 18, 19 und dem Vektor pMAL-c5X mit den Primern MBP_IW_F und MBP_IW_R; Bahnen 1 und 2: Klon 18 und 19, Bahn 3: Vektor pMAL-c5X, Bahn 4: Quick-Load Purple 2-Log DNA Ladder; Pfeil markiert das PCR-Produkt + Insert (mit den Primern MBP_IW_F und MBP_IW_R)

Die Auswertung der Sequenzdaten von den Klonen 18 und 19 zeigten, dass diese die Restriktionsschnittstellen für *XmnI* und *EcoRI* sowie das in der richtigen Orientierung und vollständig integrierte Insert der repetitiven IW-Sequenz enthielten (nicht gezeigt). Somit wurden diese Klone als positiv verifiziert und mit dem Klon 18, im Weiteren als pMALIW K18 bezeichnet, alle weiteren Experimente in *E. coli* durchgeführt.

3.3 Kultivierung und Expression mit *E. coli*

3.3.1 Optimierung der Proteinexpression des löslichen MBP-IW

Mit dem positiven Klon pMALIW K18 wurden vor der Proteinproduktion verschiedene Parameter geprüft, um die Wachstumsbedingungen bzw. die Produktion von MBP-IW (52 kDa) zu optimieren (siehe Kapitel 2.5.2). Die Parameter waren verschiedene IPTG-Konzentrationen zur Induktion der Proteinexpression, Wachstumstemperaturen sowie unterschiedliche Zeitpunkte zur Ernte der Bakterienkultur. Zur Beurteilung, welche Bedingungen die bestmöglichen waren, diente das Verhältnis von einer maximalen Ausbeute an löslich produziertem MBP-IW zu unlöslich produziertem MBP-IW (vorhanden in Inclusion Bodies) nach dem Zellaufschluss. Im Folgenden sind exemplarisch ein schlechtes Verhältnis von löslich zu unlöslich produziertem MBP-IW (Abbildung 3.3 A) sowie ein gutes Verhältnis von löslichem zu unlöslichem MBP-IW (Abbildung 3.3 B) dargestellt.

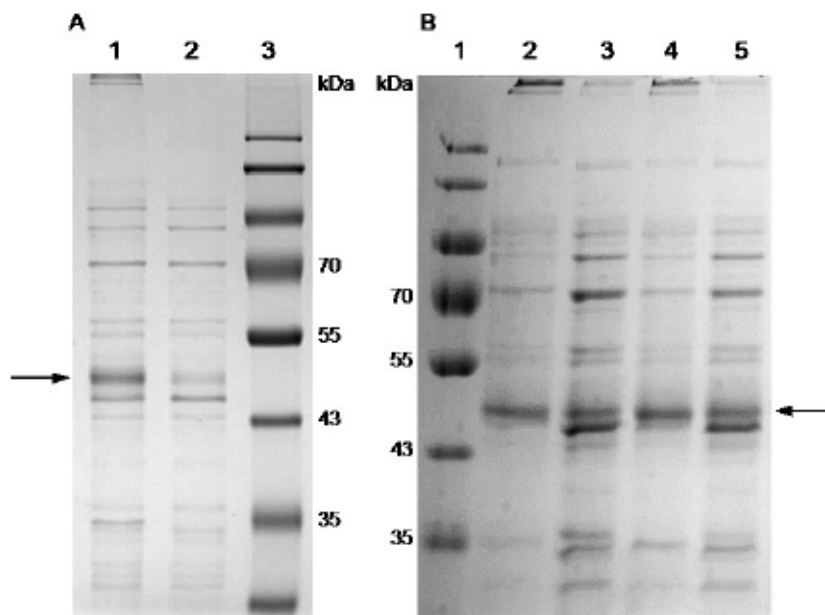


Abbildung 3.3: **A) Elektrophoretische Auftrennung mittels 12 % SDS-Gel der Proben von der Proteinexpression bei 37 °C nach 1 h;** Bahn 1: unlösliche Proteine (Pellet) nach 1 mM IPTG, Bahn 2: lösliche Proteine (Überstand) nach 1 mM IPTG, Bahn 3: PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Pfeil markiert MBP-IW; **B) Elektrophoretische Auftrennung mittels 10 % SDS-Gel der Proben von der Proteinexpression bei 25 °C nach 6 h;** Bahn 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Bahn 2: unlösliche Proteine (Pellet) nach 0,1 mM IPTG, Bahn 3: lösliche Proteine (Überstand) nach 0,1 mM IPTG, Bahn 4: unlösliche Proteine (Pellet) nach 0,5 mM IPTG, Bahn 5: lösliche Proteine (Überstand) nach 0,5 mM IPTG; Pfeil markiert MBP-IW

In Abbildung 3.3 A zeigte sich im Pellet nach dem Zellaufschluss (unlösliche Proteine) eine markante Bande bei etwa 52 kDa (Bahn 1, Pfeil). In der Probe vom Überstand (lösliche Proteine; Bahn 2) war diese Bande nach der Induktion mit IPTG ebenfalls zu erkennen, jedoch deutlich schwächer. Hingegen zeigt die Abbildung 3.3 B ein gutes Verhältnis. MBP-IW wurde weiterhin unlöslich produziert (Bahn 2 und 4, Pfeil), aber hier war auch ein deutlich größerer bzw. quantitativ ähnlicher Anteil an löslichem MBP-IW (Bande bei 52 kDa, Bahn 3 und 5, Pfeil) im SDS-Gel zu erkennen.

In Tabelle 3.1 wurden die verschiedenen Parameter zusammengefasst und nach ihrem Verhältnis von löslich zu unlöslich produziertem MBP-IW beurteilt. Da eine Wachstumstemperatur von 37 °C generell ungünstig für ein gutes Expressionsverhältnis war, konnte diese für eine weitere Proteinexpression ausgeschlossen werden und die Parameter werden nicht in der Tabelle 3.1 mitberücksichtigt. Auf Grund der Ergebnisse des Verhältnisses von löslichem zu unlöslichem MBP-IW wurde für die Produktion des Proteins im Weiteren vorzugsweise eine Kultivierungsdauer der induzierten *E. coli* Bakterienkultur von etwa 6 h gewählt. Obwohl nach 6 h sowohl für 25 °C als auch für 30 °C Kultivierungstemperatur ein gutes Verhältnis von löslichem zu unlöslichem MBP-IW erzielt werden konnte (Tabelle 3.1), wurde für die Proteinexpression eine Wachstumstemperatur von 25 °C gewählt, da hier auch ein gutes Verhältnis nach einer Kultivierungsdauer von 21 h vorlag. Bei diesem Vorgehen konnte erwartet werden, dass das Ergebnis weniger von der Kultivierungsdauer im Einzelfall abhängig war. Hinsichtlich der verwendeten IPTG-Konzentrationen konnte weder bei 25 °C noch bei 30 °C ein Unterschied ermittelt werden, weshalb nachfolgend immer die geringere mit 0,1 mM verwendet wurde.

Tabelle 3.1: Beurteilung des Verhältnisses der Expression von löslichem MBP-IW zu unlöslichem MBP-IW bei einem Wachstum der Bakterien unter verschiedenen Bedingungen

Bedingungen	Verhältnis von löslichem zu unlöslichem MBP-IW			
	30 °C		25 °C	
Wachstumszeit	0,1 mM IPTG	0,5 mM IPTG	0,1 mM IPTG	0,5 mM IPTG
4 h	x	x	x	x
6 h	+	+	+	+
21 h	x	x	+/x	+/x
28 h	x	x	x	x
47 h	x	x	x	x

x: schlechtes Verhältnis; +: gutes Verhältnis

3.4 Proteinreinigung von MBP-IW aus *E. coli* und Isolation von rIW

3.4.1 Proteinreinigung

3.4.1.1 Reinigung über Affinitätschromatographie

Der erste Reinigungsschritt mittels Affinitätschromatographie wurde wie unter 2.6.1.2 beschrieben durchgeführt. Als Auftrag diente der Überstand vom Klon pMALIW K18 nach dem Zellaufschluss. Abbildung 3.4 (Zeitauflösung vergrößert in Abbildung 3.5) zeigt exemplarisch das Chromatogramm einer Auftrennung. Zu Beginn (während des Auftrags) wurde durch Verunreinigungen, Pufferbestandteile und andere Proteine eine hohe Absorption detektiert (vom Beginn des Laufs bis etwa 250 min, Abbildung 3.4), welche beim Waschschrift wieder sank (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5).

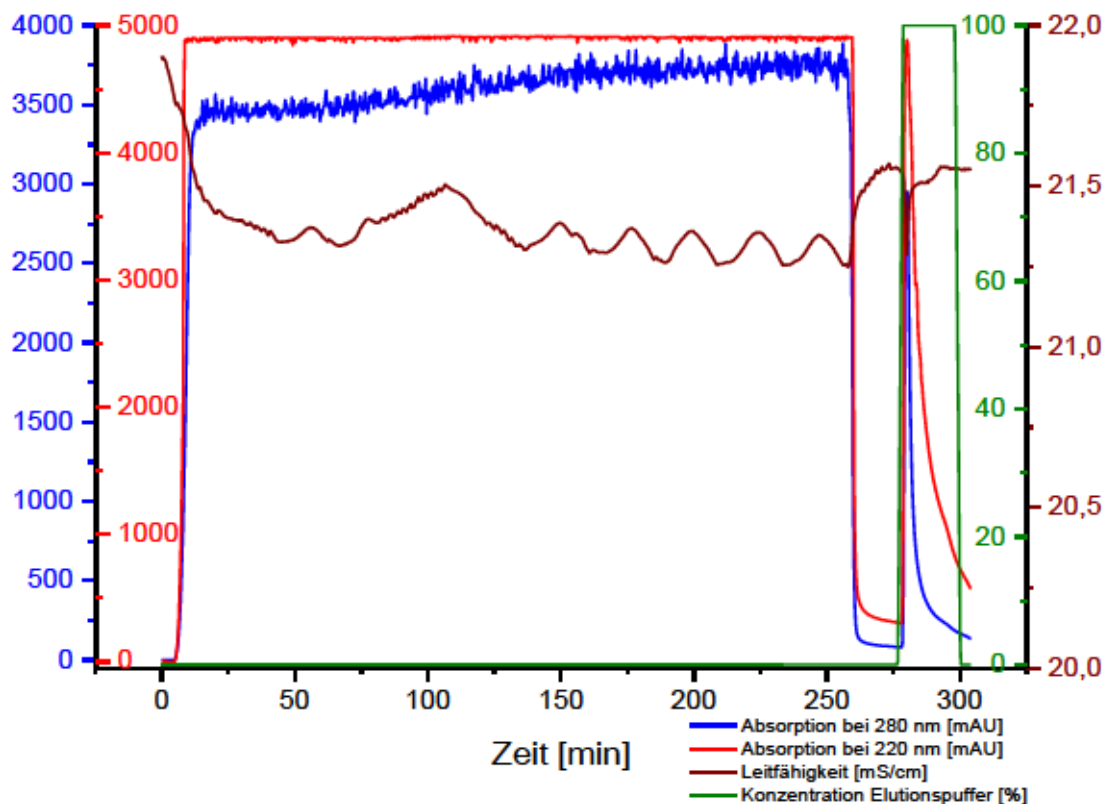


Abbildung 3.4: Exemplarisches Chromatogramm des ersten Reinigungsschritts (Affinitätschromatographie) mit von *E. coli* produzierten Proteinen; UV-Detektion bei $\lambda = 280$ nm [mAU] (blaue Linie) und $\lambda = 220$ nm [mAU] (rote Linie); Die braune Linie gibt die Leitfähigkeit in mS/cm an; Die Konzentration des Elutionspuffers im Gradientenmischer [%] ist durch die grüne Linie gekennzeichnet

Nach Erhöhung der Konzentration des Elutionspuffers ab 277 min eluierte das gebundene Protein ab etwa 279 min von der Säule (Abbildung 3.5). Die Elutionsfraktionen innerhalb des Peaks (Bereich zwischen den senkrecht gestrichelten Linien, 22 Fraktionen à 500 µl) wurden mittels SDS-PAGE analysiert, um den Reinigungsschritt zu prüfen.

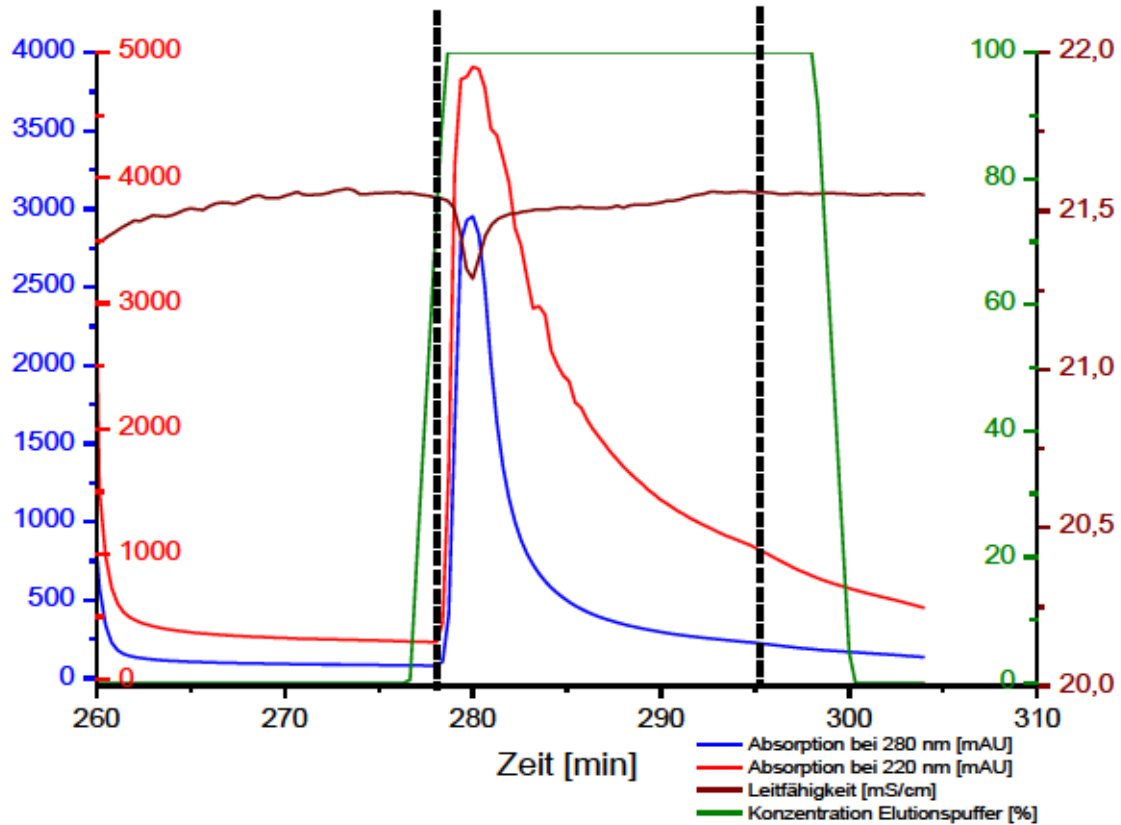


Abbildung 3.5: Exemplarisches Chromatogramm des ersten Reinigungsschritts (Affinitätschromatographie) mit von *E. coli* produzierten Proteinen, zeitliche Auflösung der Elution vergrößert; UV-Detektion bei $\lambda = 280$ nm [mAU] (blaue Linie) und $\lambda = 220$ nm [mAU] (rote Linie); Die braune Linie gibt die Leitfähigkeit in mS/cm an; Die Konzentration des Elutionspuffers im Gradientenmischer [%] ist durch die grüne Linie gekennzeichnet; Bereich zwischen den senkrecht gestrichelten Linien zeigt, in welchem Zeitbereich die Elutionsfraktionen gesammelt und einzeln analysiert wurden

Die Analyse mittels SDS-PAGE der Zellen nach dem Aufschluss zeigte, dass MBP-IW sowohl unlöslich (im Pellet, Abbildung 3.6, uP) als auch gleichwertig löslich (im verdünnten Überstand, A) produziert wurde. Es konnte nicht das gesamte Protein MBP-IW an die Säule gebunden werden, da auch in den Fraktionen des Durchflusses entsprechende Banden im Bereich von MBP-IW zu finden waren (D). Was an die Säule gebunden wurde, blieb auch während des Waschschriffs fest auf der MBPTrap HP Säule, da keinerlei Proteine in der

entsprechenden Probe detektiert wurden (W). In allen analysierten Proben der einzelnen Elutionsfraktionen wurde das Protein MBP-IW detektiert und konnte somit erfolgreich eluiert werden (Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7, Pfeil). Die Fraktionen zu Anfang des Peaks (Fraktionen 2-5, Abbildung 3.6, F2-F5) waren jedoch noch sehr verunreinigt, was vor allem auf ein Protein bei etwa 42 kDa zurückzuführen war. Die Fraktionen 2-12 (Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7, F2-F12) enthielten den größten Anteil an MBP-IW und wurden daher für den zweiten Reinigungsschritt gepoolt und als Auftrag eingesetzt.

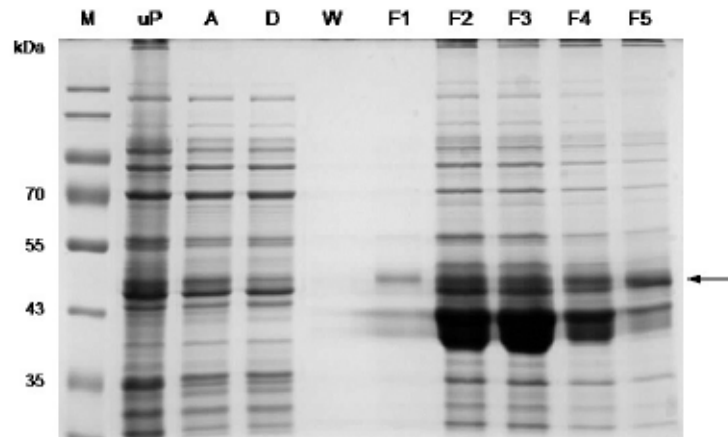


Abbildung 3.6: Elektrophoretische Auftrennung mittels 10 % SDS-Gel der Proben vom ersten Reinigungsschritt (Affinitätschromatographie); M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, uP: unlösliches Protein nach dem Zellaufschluss, A: lösliches Protein nach dem Zellaufschluss (Auftrag 6-fach mit Säulenpuffer verdünnt), D: Durchfluss, W: Waschschrift, F1-F5: Fraktion 1-5; Pfeil markiert MBP-IW

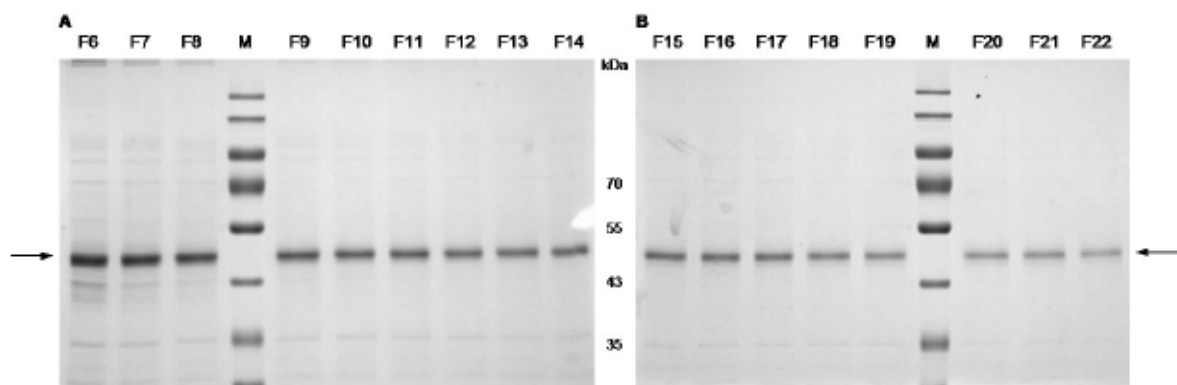


Abbildung 3.7: Elektrophoretische Auftrennung mittels 10 % SDS-Gel der Proben vom ersten Reinigungsschritt (Affinitätschromatographie); A) F6-F8: Fraktion 6-8, M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, F9-F14: Fraktion 9-14; Pfeil markiert MBP-IW; B) F15-F19: Fraktion 15-19, M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, F20-F22: Fraktion 20-22; Pfeil markiert MBP-IW

3.4.1.2 Reinigung über Größenausschlusschromatographie

Der zweite Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie wurde über die HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Säule wie beschrieben (2.6.1.3) durchgeführt. Als Auftrag dienten die Elutionsfraktionen, welche nach der Affinitätschromatographie den höchsten Gehalt an MBP-IW enthielten (hier exemplarisch die Fraktionen 2-12, siehe 3.4.1.1). Diese wurden vereint und über eine 5 ml Injektionsschleife auf die Säule geladen. In Abbildung 3.8 ist ein Chromatogramm des Laufs exemplarisch dargestellt. In den Chromatogrammen aller Läufe waren drei Peaks mittels UV-Detektion zu erkennen. Bei der erstmaligen Verwendung der Methode wurden alle Fraktionen innerhalb dieser Peaks mit SDS-PAGE analysiert. Das Protein MBP-IW befand sich in den Fraktionen des ersten Peaks (nicht gezeigt) und eluierte demnach im ersten und gleichzeitig höchsten Peak ab etwa 40 min. Von diesen Elutionsfraktionen (Bereich zwischen den senkrecht gestrichelten Linien, 26 Fraktionen à 750 µl) wurden Proben mittels SDS-PAGE analysiert. Nach etwa 115 min passierten die Salze vom Säulenpuffer (Puffer, in dem Proteine aus dem ersten Reinigungsschritt enthalten waren) die Säule, was zur Erhöhung der Leitfähigkeit führte.

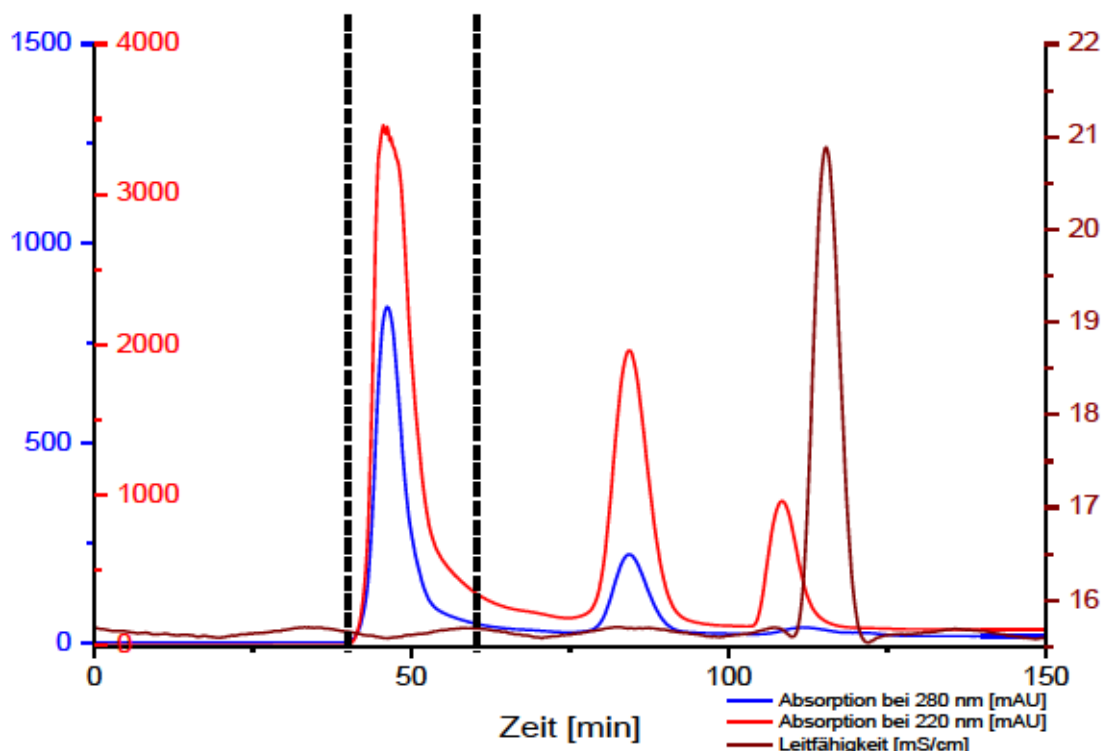


Abbildung 3.8: Exemplarisches Chromatogramm des zweiten Reinigungsschritts (Größenausschlusschromatographie) mit von *E. coli* produzierten Proteinen; UV-Detektion bei $\lambda = 280$ nm [mAU] (blaue Linie) und $\lambda = 220$ nm [mAU] (rote Linie); Die braune Linie gibt die Leitfähigkeit in mS/cm an; Bereich zwischen den senkrecht gestrichelten Linien zeigt, in welchem Zeitbereich die Elutionsfraktionen gesammelt und einzeln analysiert wurden

Die nachfolgende Analyse der einzelnen Elutionsfraktionen innerhalb des Peaks mittels Elektrophorese zeigte, dass das Protein MBP-IW durch den zweiten Reinigungsschritt sauber isoliert werden konnte (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10, Pfeil). Das Protein mit einer Größe von etwa 42 kDa, welches nach dem ersten Reinigungsschritt vorhanden war (Auftrag: A, gepoolte Fraktionen nach der Affinitätschromatographie, Abbildung 3.9), konnte mit dem zweiten Reinigungsschritt entfernt werden. Das Protein lag nun in der gewünschten Reinheit vor und die Fraktionen 4-17 (hier exemplarisch) mit dem größten Anteil an MBP-IW (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10, F4-F17) wurden zusammengebracht und dienten als Probe für die anschließende Hydrolyse von MBP-IW.

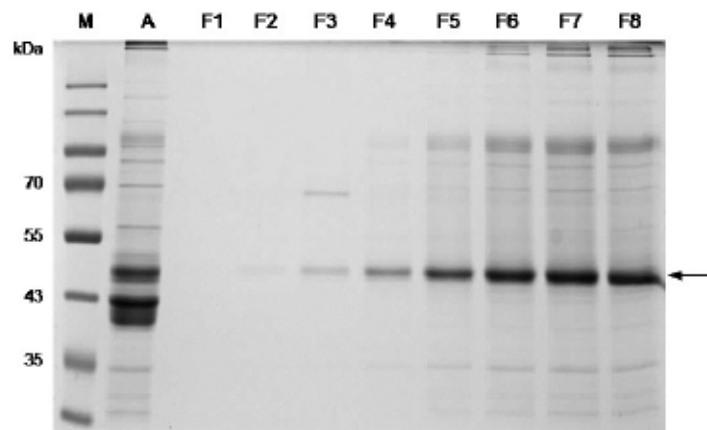


Abbildung 3.9: Elektrophoretische Auftrennung mittels 10 % SDS-Gel der Proben vom zweiten Reinigungsschritt (Größenausschlusschromatographie); M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, A: Auftrag (gepoolte Fraktionen nach Affinitätschromatographie), F1-F8: Fraktion 1-8; Pfeil markiert MBP-IW

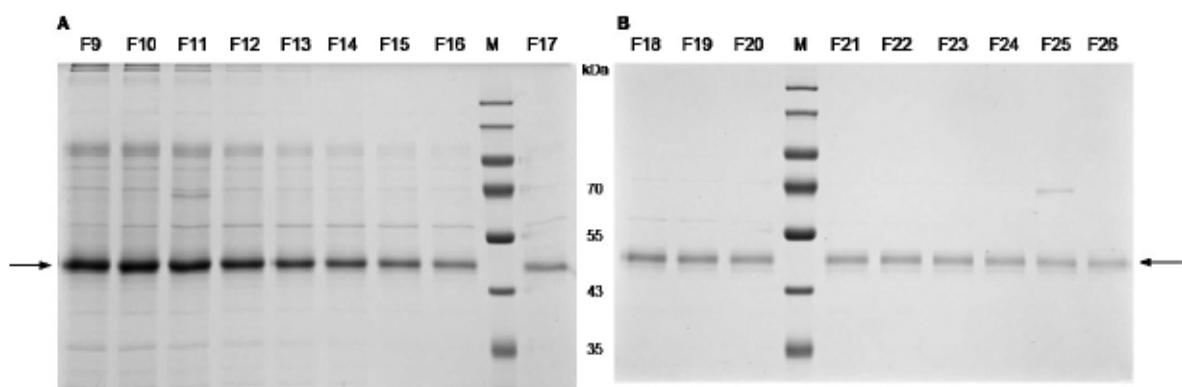


Abbildung 3.10: Elektrophoretische Auftrennung mittels 10 % SDS-Gel der Proben vom zweiten Reinigungsschritt (Größenausschlusschromatographie); A) F9-F16: Fraktion 9-16, M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, F17: Fraktion 17; Pfeil markiert MBP-IW; B) F18-F20: Fraktion 18-20, M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, F21-F26: Fraktion 21-26; Pfeil markiert MBP-IW

Im letzten Schritt sollte laut pMAL Protein Fusion&Purification System das gereinigte Protein (MBP-IW) mit Hilfe der Protease Faktor Xa an der spezifischen Schnittstelle voneinander getrennt werden (IW-Konstrukt einzeln ohne Bindung an MBP). Hierfür wurden die Fraktionen, welche die größte Menge des isolierten Proteins MBP-IW nach der Reinigung enthielten vereint, eine Proteinbestimmung durchgeführt (2.3.1) und das Protein MBP-IW unter verschiedenen Bedingungen mit dem Enzym Faktor Xa inkubiert (detaillierte Information hierzu siehe Anhang Kapitel 8.1.2). Es war jedoch nicht möglich, das IW-Konstrukt vom Affinitätstag MBP zu trennen (Anhang, 8.2.1). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hydrolyse immer mit dem kompletten Protein MBP-IW durchgeführt und nicht nur mit dem 10 kDa großen IW-Konstrukt.

3.4.2 Hydrolyse von MBP-IW und Isolation von rIW

3.4.2.1 Beurteilung der Hydrolyse

Es wurde geprüft, ob ein einstufiger (α -Chymotrypsin) oder ein zweistufiger Enzymverdau (α -Chymotrypsin und Thermolysin) besser geeignet war, um möglichst viel rIW freizusetzen. Es zeigte sich, dass es zwischen den beiden Methoden beim Verdau des gereinigten MBP-IW Proteins keinen Unterschied bezüglich der rIW-enhaltenden Fraktionen gab. Falls das Protein MBP-IW jedoch nicht ausreichend vorgereinigt wurde (z.B. lediglich eine Reinigung über die Affinitätschromatographie), war der einstufige Enzymverdau besser, um reines rIW zu isolieren. Bei einem zweistufigen Enzymverdau und der nachfolgenden Isolation von rIW hatten die meisten Fraktionen nämlich eine geringere Reinheit (nicht gezeigt). Der zusätzliche Verdau mit dem Enzym Thermolysin war demnach überflüssig und bei der Hydrolyse wurde nachfolgend nur ein einstufiger Enzymverdau (α -Chymotrypsin) mit dem gereinigten MBP-IW durchgeführt.

3.4.2.2 Isolation von rIW über Größenausschlusschromatographie

Nach der Hydrolyse des Proteins MBP-IW (2.6.2.2) musste das Dipeptid rIW von den restlichen Bestandteilen isoliert werden. Hierfür wurde eine erneute Größenausschlusschromatographie durchgeführt (2.6.2.3). Zuerst wurden fünf Standards in einer Lösung auf die Säule gegeben, um die Elutionszeit von IW zu detektieren. Bei den Standards handelte es sich um Albumin Fraktion V (66.000 Da), Bradykinin (1.060,22 Da), IW (317,39 Da), VY (280,32 Da) und W (204,23 Da). Nach etwa 45 min eluierte IW (vierter Peak im Chromatogramm, Abbildung 3.11).

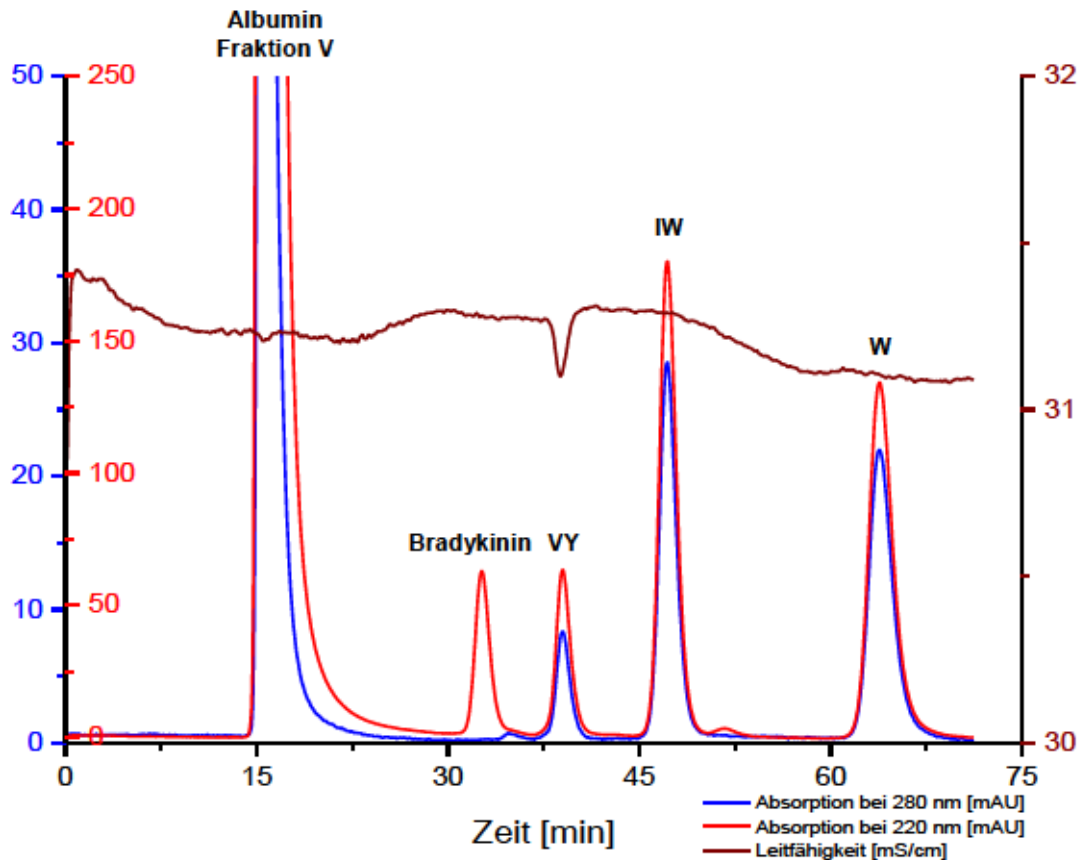


Abbildung 3.11: Chromatogramm der zeitlichen Detektion von IW (Größenausschlusschromatographie) mit fünf Standards; UV-Detektion bei $\lambda = 280$ nm [mAU] (blaue Linie) und $\lambda = 220$ nm [mAU] (rote Linie); Die braune Linie gibt die Leitfähigkeit in mS/cm an

Die Isolation von rIW wurde, wie unter 2.6.2.3 beschrieben, durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente die hydrolysierte Probe. Die Abbildung 3.12 zeigt exemplarisch ein Chromatogramm vom Lauf der Isolation von rIW. Zwischen 20 und etwa 45 min waren verschiedene Peaks vorhanden, welche ineinander übergingen. Der größte Peak bei 46-52 min wurde zur Retentionszeit von IW detektiert. Alle einzelnen Elutionsfraktionen innerhalb dieses Peaks (Bereich zwischen den senkrecht gestrichelten Linien, sechs Fraktionen à 500 μ l) wurden nachfolgend mit der RP-HPLC analysiert (2.6.2.4).

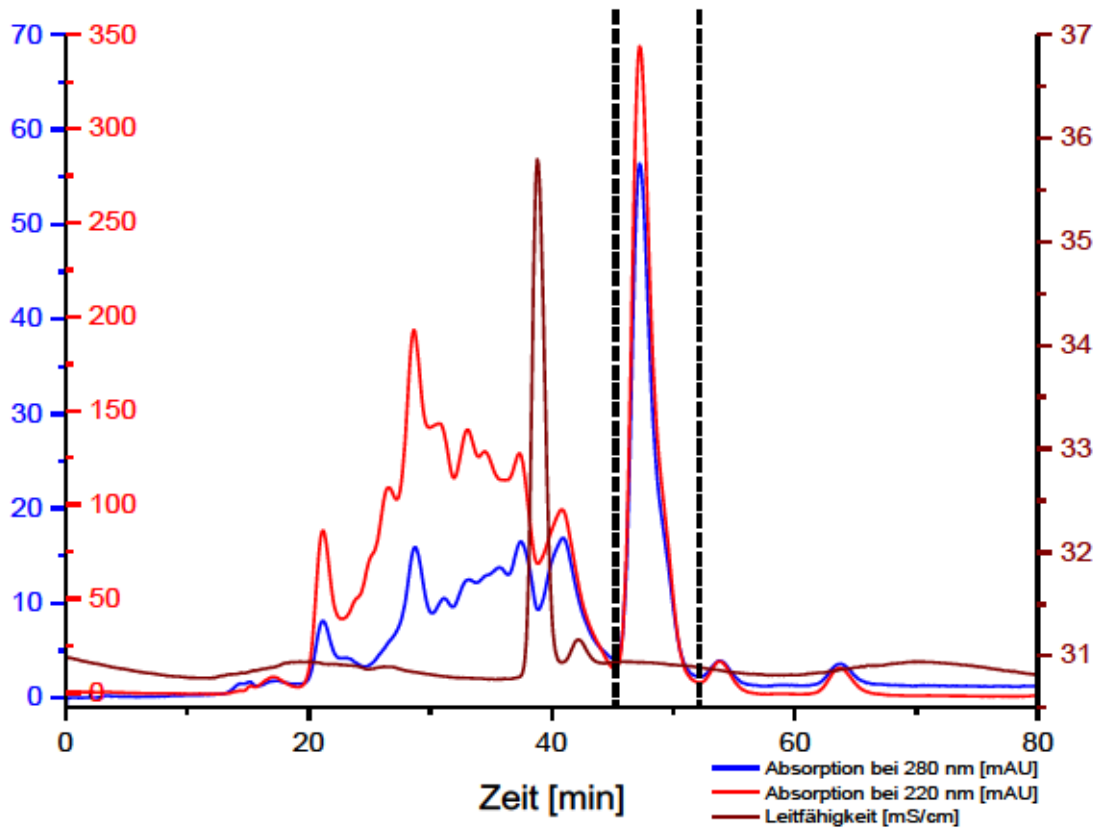


Abbildung 3.12: Exemplarisches Chromatogramm der Isolation von IW (Größenausschlusschromatographie); UV-Detektion bei $\lambda = 280$ nm [mAU] (blaue Linie) und $\lambda = 220$ nm [mAU] (rote Linie); Die braune Linie gibt die Leitfähigkeit in mS/cm an; Bereich zwischen den senkrecht gestrichelten Linien zeigt, in welchem Zeitbereich die Elutionsfraktionen gesammelt und einzeln analysiert wurden

3.4.3 Ausbeuteberechnung

Die Ausbeuteberechnung von rIW wurde mit den Ergebnissen durchgeführt, welche unter optimierten Bedingungen erhalten wurden. Als Grundlage diente die Proteinbestimmung der vereinten und konzentrierten Elutionsfraktionen nach dem zweiten Reinigungsschritt, welche das aufgereinigte MBP-IW enthielten und für die Hydrolyse (einstufiger Enzymverdau) eingesetzt wurden (siehe 2.6.2.2). Anhand dieser Konzentration konnte auf Grund des Molekulargewichts von IW und der Anzahl an vorhandenen IW-Dipeptiden (16-mal) im Protein MBP-IW der theoretisch mögliche Gehalt an rIW berechnet werden, welcher nach der Hydrolyse und Isolation von rIW erreicht werden konnte. Der Gehalt an rIW in den einzelnen Fraktionen nach der Isolation von rIW über die Größenausschlusschromatographie (siehe 2.6.2.3), welcher mit der RP-HPLC bestimmt wurde (2.6.2.4), wurde für die Berechnung der tatsächlichen Ausbeute an rIW verwendet.

Aus 1 g *E. coli* (Feuchtgewicht vom Zellpellet) wurden unter optimierten Bedingungen im Mittel 0,52 mg lösliches MBP-IW gereinigt. Theoretisch könnten aus diesen 0,52 mg MBP-IW 50,78 µg rIW isoliert werden. Nach der Hydrolyse und Isolation wurden im Mittel 14 µg rIW gewonnen. Auf Grundlage des theoretisch möglichen Wertes von 50,78 µg rIW betrug die Ausbeute demnach etwa 28 % (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Ausbeute an rIW unter optimierten Bedingungen

Pellet- gewicht [g]	MBP-IW pro 1 g Pellet [mg]	theoretischer Anteil an rIW pro 1 g Pellet [µg]	Anteil an rIW pro 1 g Pellet [µg]	Ausbeute an rIW pro 1 g Pellet [%]
3,09	0,48		11,89	
3,09	0,48		13,64	
3,15	0,53		14,70	
2,77	0,60		14,45	
Mittelwert	Mittelwert	berechnet	Mittelwert	berechnet
3,03	0,52	50,78	14	28

3.5 Analytik von rIW

Die Fraktionen, die nach der Isolation über die Größenausschlusschromatographie eine Reinheit an rIW von $\geq 96\%$ aufwiesen (chromatographisch ermittelt, siehe 2.6.2.4), wurden zusammengeführt, lyophilisiert, anschließend in 1 ml ddH₂O gelöst und mittels verschiedener Techniken analysiert.

3.5.1 RP-HPLC

Zuerst wurde das isolierte rIW 10-fach verdünnt und über die RP-HPLC im Vergleich zu 20 μ M cIW analysiert. Es zeigte sich ein gleiches Elutionsprofil von beiden IW-Proben. Lediglich bei etwa 8 min war ein kleiner weiterer Peak im Lauf von rIW zu erkennen (Abbildung 3.13).

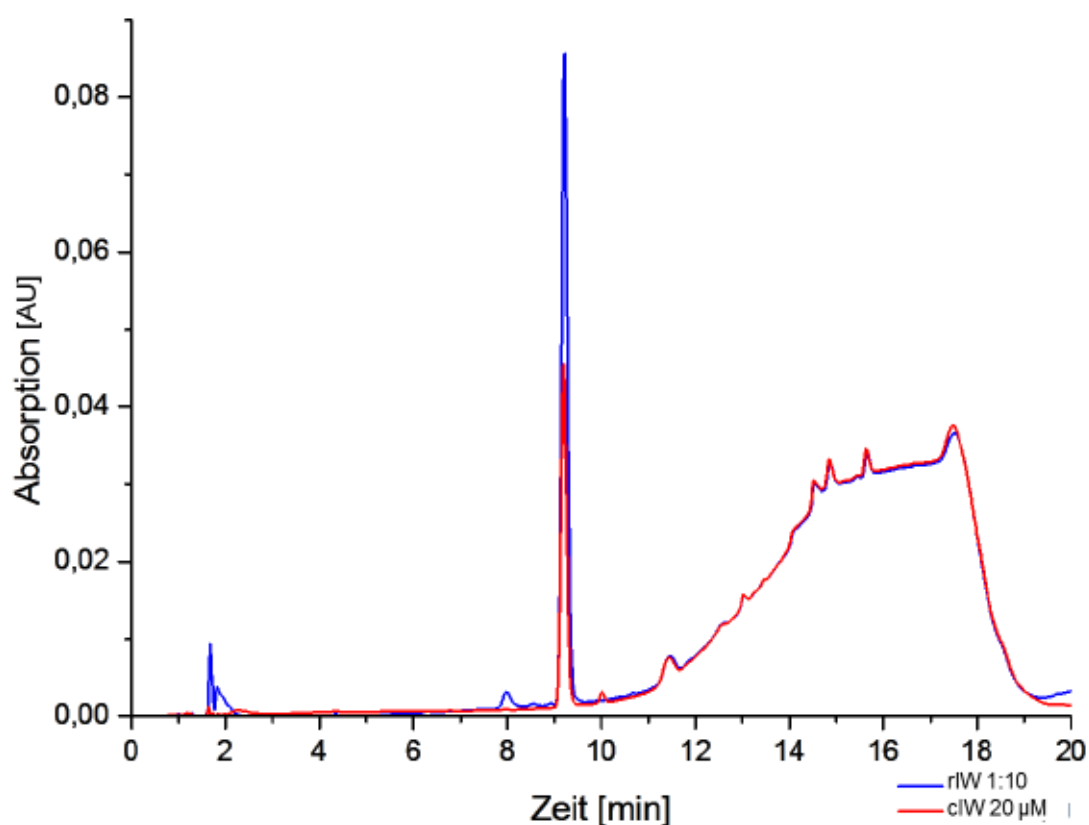


Abbildung 3.13: RP-HPLC-Chromatogramm von der 1:10 verdünnten rIW-Probe (blaue Linie) im Vergleich zur 20 μ M cIW-Probe (rote Linie); UV-Detektion bei $\lambda = 228$ nm [AU]

3.5.2 LC-ESI-MS/MS

Zusätzlich wurde noch eine Messung mit der LC-ESI-MS/MS der Probe von rIW durchgeführt. Die spezifische molare Masse für IW ($\text{IW} + \text{H}^+ = 318,2 \text{ g/mol}$) konnte detektiert werden (Abbildung 3.14).

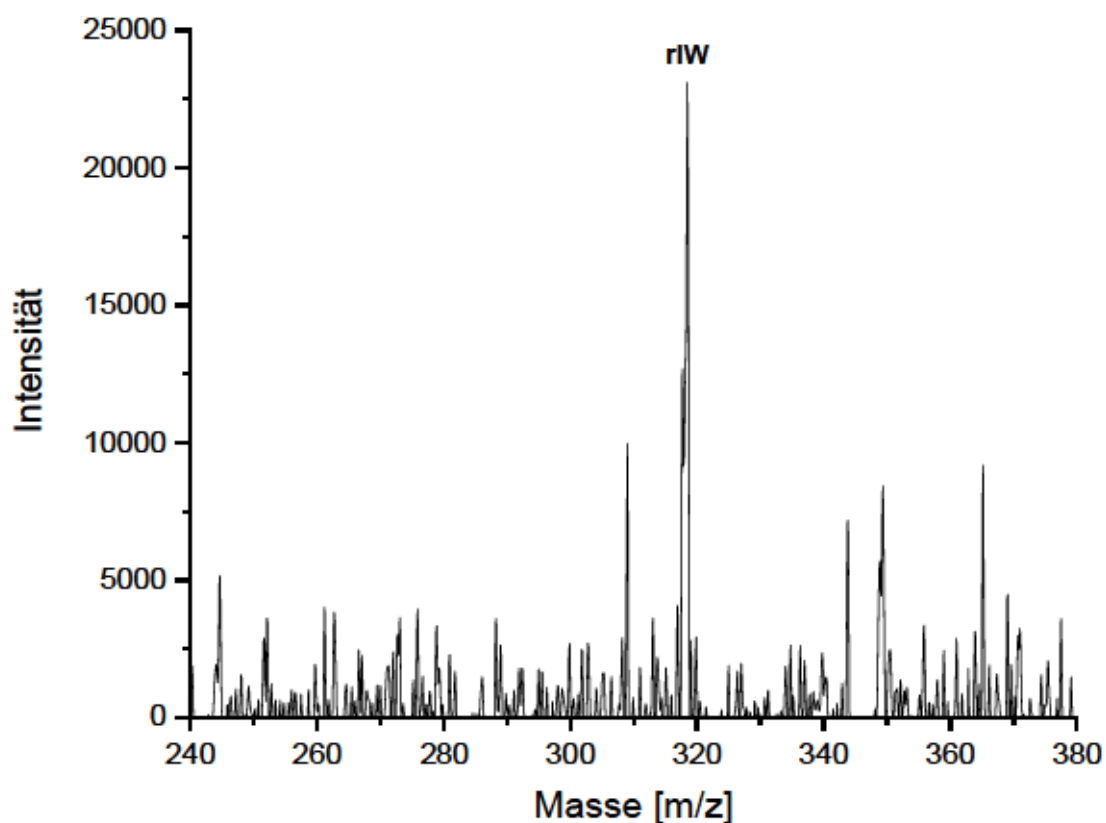


Abbildung 3.14: Massenspektrum von rIW mit der spezifischen molaren Masse von IW ($\text{IW} + \text{H}^+ = 318,2 \text{ g/mol}$)

Die Abbildung 3.15 zeigt dies nochmals nach der Zeit (Elutionszeit mit cIW als Standard geprüft) sowie den für IW typischen und einzigartigen Transfer zu 188,0 g/mol (rote Linie).

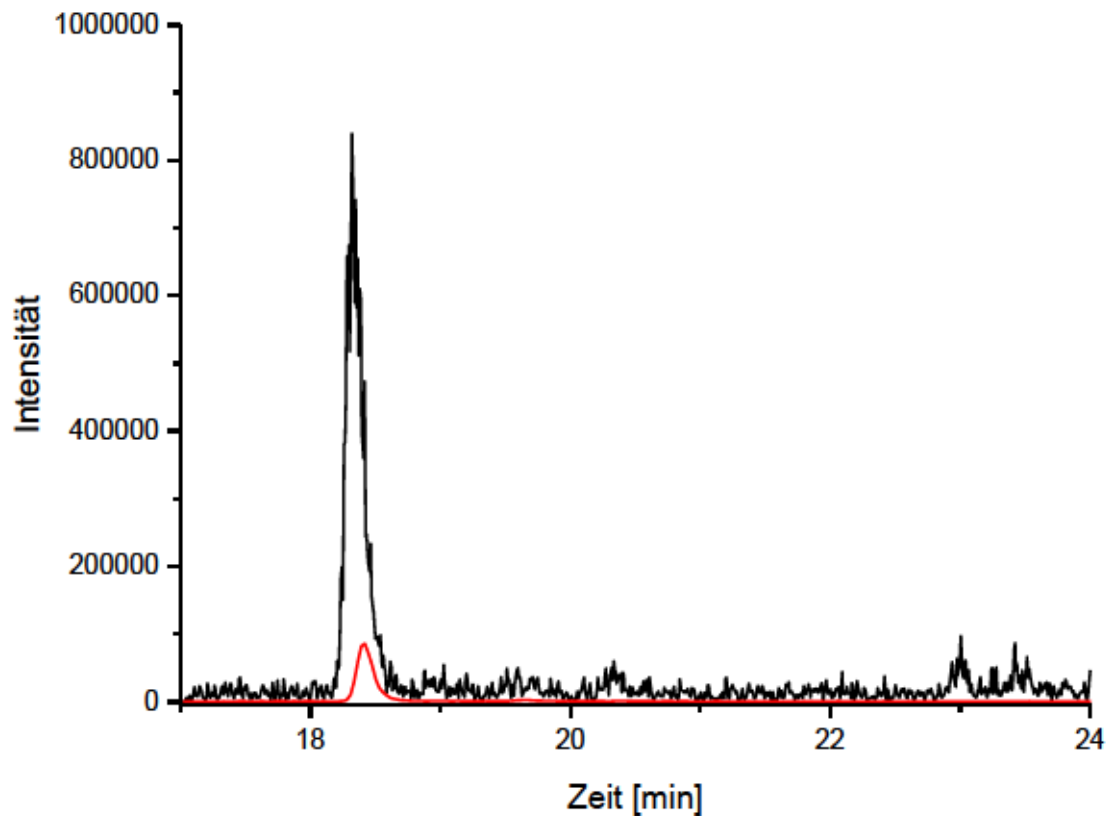


Abbildung 3.15: Extracted Ion Chromatogramm mit der spezifischen molaren Masse von IW ($\text{IW} + \text{H}^+ = 318,2 \text{ g/mol}$, schwarze Linie) und den für IW typischen und einzigartigen Transfer zu 188,0 g/mol (rote Linie)

3.5.3 Identifizierung der N-terminalen Aminosäure im Dipeptid

Zur eindeutigen Identifizierung, dass es sich im rIW bei der N-terminalen Aminosäure um Isoleucin handelt, wurde eine Derivatisierung mit Dansylchlorid, welches spezifisch am N-Terminus bindet, durchgeführt. Abbildung 3.16 zeigt die derivatisierten Produkte von rIW, cIW und cDIW. Alle drei Proben eluierten zur selben Zeit (etwa bei 13,5-14 min) und dies bestätigt somit die Identität von rIW.

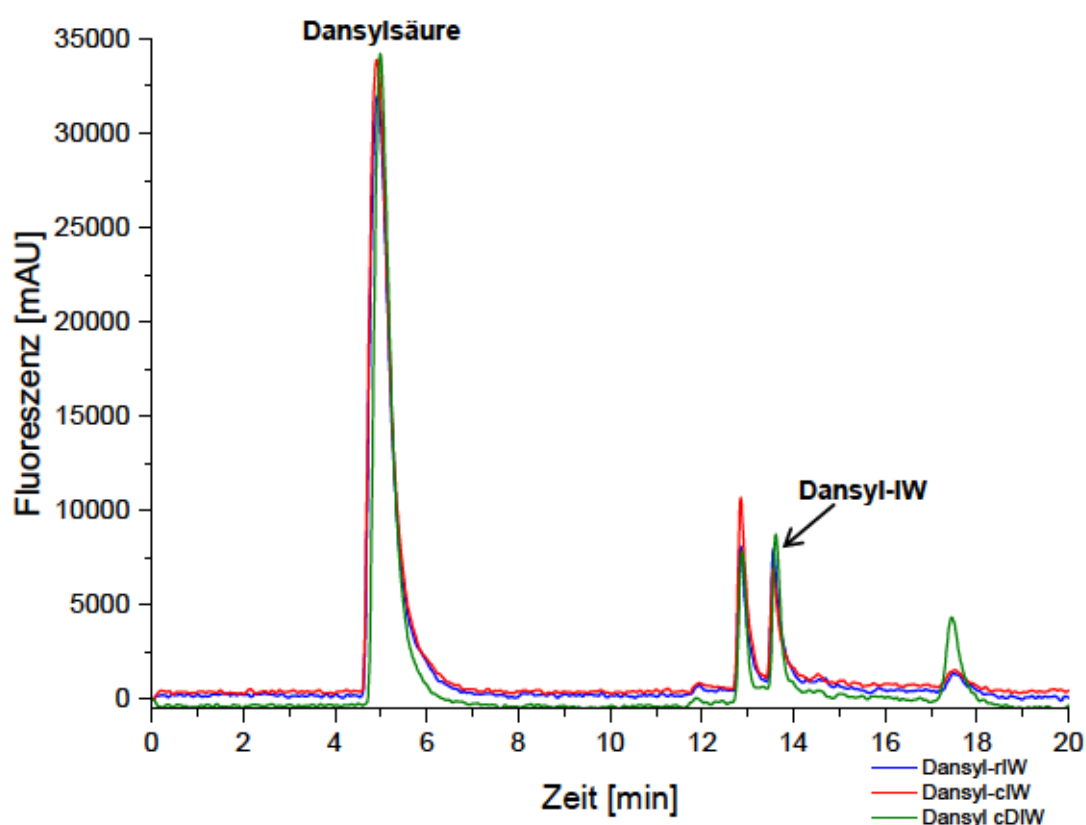


Abbildung 3.16: RP-HPLC-Chromatogramm von dem mit Dansylchlorid derivatisierten rIW (blaue Linie), cIW (rote Linie) und cDIW (grüne Linie); Fluoreszenzdetektion bei $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 506 \text{ nm}$; Pfeil markiert Dansyl-IW

3.6 Klonierung in *K. lactis*

3.6.1 PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten und Aufreinigung

Mit Hilfe der PCR, unter Verwendung der Primer MALIW_pLAC_Xho_F und MALIW_pLAC_Eco_R, wurde ein neues DNA-Fragment hergestellt. Dieses enthält die codierende Sequenz für MBP-IW sowie weitere Nukleinsäuren, die eine Sekretion des Proteins in das Medium ermöglichen (2.8.1). Als Grundlage diente die DNA des Klons pMALIW K18 aus den Klonierungsarbeiten mit *E. coli* (siehe 2.4).

Die gemessenen DNA-Konzentrationen für die PCR-Produkte nach der Aufreinigung aus dem Agarosegel lagen für pMALIW K18_1 mit 134,83 ng/µl und für pMALIW K18_2 mit 146,93 ng/µl in einem ähnlichen Konzentrationsbereich.

3.6.2 Verdau von Plasmid-DNA sowie PCR-Fragment mit Restriktionsenzymen und Aufreinigung

Um die neu generierten PCR-Produkte vom Klon pMALIW K18 (pMALIW K18_1 und pMALIW K18_2; 2.8.1) in den Expressionsvektor pKLAC2 einbringen zu können, mussten die PCR-Produkte und der Vektor mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*-HF und *XhoI* verdaut werden (2.8.2). Die Produkte wurden im Agarosegel analysiert, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und aufgereinigt. Die gemessene Konzentration der DNA lag nach der Aufreinigung zwischen 34,64–52,52 ng/µl. Anschließend erfolgte die Ligation und Transformation der DNA in den Übergangswirt *E. coli*.

3.6.3 Detektion positiver Klone

Mit den neu generierten Plasmiden erfolgte eine Detektion der positiven Klone. Nach dem Kontrollverdau und Konzentrationsbestimmung der DNA von den gepickten Klonen nach der Transformation wurden drei Klone sequenziert, um zu prüfen, ob das Insert richtig in den Expressionsvektor pKLAC2 integriert wurde.

Bei der Auswertung der Sequenzdaten wiesen alle drei ausgewählten Klone die Sequenzabschnitte für das Ende des für MBP codierenden *malE*-Gens und die Restriktionsschnittstellen von *XmnI* bzw. *EcoRI* mit der dazwischen befindlichen repetitiven IW-Sequenz auf. Außerdem ging diese Sequenz innerhalb der MCS nahtlos in den Vektor pKLAC2 über, wodurch die drei Klone als positiv verifiziert wurden (nicht gezeigt). Mit dem Klon pKLAC2-MBPIW Klon 10, im Weiteren als pKLAC2-MBPIW K10 bezeichnet, wurden alle weiteren Experimente durchgeführt.

3.6.4 Linearisierung und Integration in *K. lactis*

Um den gewünschten codierenden DNA-Abschnitt für MBP-IW in das Genom von *K. lactis* zu integrieren, musste der neu generierte Vektor mit dem Restriktionsenzym *SacII* linearisiert werden. Zur Kontrolle wurde der Vektor pKLAC1-*malE*, welcher MBP exprimiert, ebenfalls linearisiert (2.8.6).

Nach der Linearisierung wurde die DNA gereinigt und eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Anhand der Konzentrationen von 27,53 ng/µl (pKLAC2-MBPIW K10) und 25,38 ng/µl (pKLAC1-*malE*) zeigte sich ein Konzentrationsverlust nach der Reinigung mit der Clean-up-Procedure. Im Vergleich zu den bei der Linearisierung eingesetzten 2 µg waren nach der Reinigung der DNA lediglich noch 761,40 bis 825,90 ng vorhanden (Elution erfolgte mit 30 µl). Nichtsdestotrotz wurden die linearisierten Plasmide für die homologe Rekombination in das *K. lactis*-Genom verwendet.

3.6.5 Identifizierung der Klone, deren Expressionskassette richtig in das Genom von *K. lactis* integriert wurde

Die linearisierten Vektoren wurden in das *K. lactis*-Genom integriert und die gewonnenen resuspendierten Zellen auf YCB Agarplatten + 5 mM Acetamid zur Selektion ausplattiert (2.8.6). Um eine Entscheidung zu treffen, mit welchem Klon weiter gearbeitet werden sollte, wurden zwei verschiedene PCR-Ansätze durchgeführt. Hierbei wurde geprüft, bei welchen Klonen die Expressionskassette (enthält codierendes Gen für MBP-IW) einfach oder mehrfach in das Hefegenom integriert wurde (2.8.7).

Bei einer einmaligen Integration der Expressionskassette in das Hefegenom wurde bei der Analyse mittels Agarosegel von den PCR-Produkten mit dem Integration Primer 1 und 2 eine Bande bei etwa 2,6 kb erwartet. Abbildung 3.17 zeigt exemplarisch die PCR-Produkte der Klone 18-20 des Ansatzes von pKLAC2-MBPIW K10 sowie die Klone 4, 5 und 13 vom pKLAC1-*malE* Vektor nach Integration in *K. lactis*. Die Bande bei 2,6 kb zeigten der Klon 20 (K20, Pfeil) sowie Klon 5 der Kontrolle (K5, Pfeil). Das gleiche Bandenmuster wiesen die Klone 1, 4-8, 10-12, 14 und 17 von pKLAC2-MBPIW K10 auf (nicht gezeigt), womit diese ebenfalls die einmalige Integration der Expressionskassette hatten.

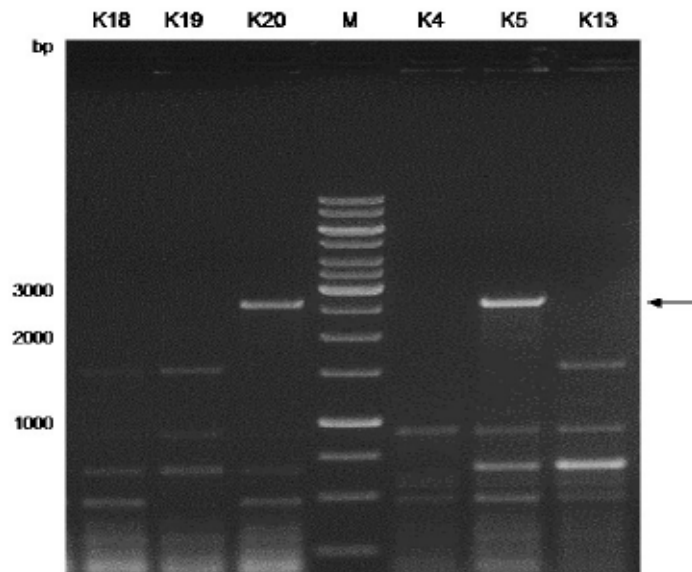


Abbildung 3.17: Elektrophoretische Auftrennung mittels 1 % Agarosegel zur Prüfung, bei welchen Klonen die Expressionskassette einmal integriert wurde (Analyse der PCR-Produkte mit Integration Primer 1 und 2, exemplarisch); K18-20: pKLAC2-MBPIW K10 Klon 18-20, M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, K4-5, K13: pKLAC1-*malE* Klon 4, 5, 13; Pfeil markiert das PCR-Produkt für eine einmalige Integration der Expressionskassette (mit Integration Primer 1 und 2)

Bei der Analyse, welche Klone die Expressionskassette mehrfach integriert hatten, sind exemplarisch die PCR-Produkte der Klone 13-20 von pKLAC2-MBPIW K10 sowie die Klone 4, 5 und 13 des pKLAC1-*malE* Vektors nach der Integration ins *K. lactis*-Genom dargestellt (Abbildung 3.18). Positiv waren alle Klone, welche nach der PCR mit dem Integration Primer 2 und 3 lediglich eine erwartete Bande bei etwa 2,6 kb zeigten (z.B. K14, Pfeil) und keine weitere markante Bande bei etwa 1,1 kb (wie z.B. K15, K16, K18 und K19). Positiv für eine mehrfache Integration der Expressionskassette waren die Klone 1, 4-8, 10-12, 14, 17 und 20 des linearisierten und in *K. lactis* integrierten pKLAC2-MBPIW K10. Für den linearisierten und in *K. lactis* integrierten pKLAC1-*malE* Vektor war der Klon 5 positiv (K5 in Abbildung 3.18).

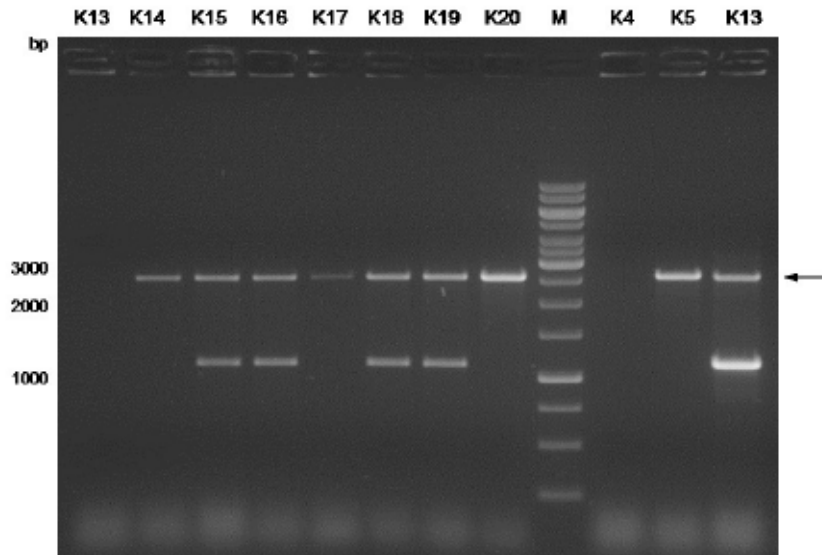


Abbildung 3.18: Elektrophoretische Auftrennung mittels 1 % Agarosegel zur Prüfung, bei welchen Klonen die Expressionskassette mehrfach integriert wurde (Analyse der PCR-Produkte mit Integration Primer 2 und 3, exemplarisch); K13-20: pKLAC2-MBPIW K10 Klon 13-20, M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, K4-5, K13: pKLAC1-*malE* Klon 4, 5, 13; Pfeil markiert das PCR-Produkt für eine mehrfache Integration der Expressionskassette (mit Integration Primer 2 und 3)

Zusammenfassend hat die Integration der mit *SacII* linearisierten Vektoren in das Hefegenom funktioniert und bei erfolgreicher Integration wurde die Expressionskassette immer mehrfach integriert.

3.6.6 Isolation von genomischer DNA und Sequenzierung

Zur Prüfung der richtigen Integration und zur kompletten Analyse wurde der Klon pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8 (mehrfach integrierte Expressionskassette) ausgewählt und eine Sequenzanalyse durchgeführt. Hierfür wurde eine neue Kultur des Klons angesetzt, die genomische DNA isoliert und eine Konzentration von 1,64 µg/µl bestimmt.

Es wurden vier verschiedene PCR-Ansätze durchgeführt, die Proben auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, die Banden anschließend ausgeschnitten und gereinigt (2.8.8). Die Konzentrationen der einzelnen PCR-Ansätze lagen zwischen 22,14 ng/µl (PCR III) und 40,38 ng/µl (PCR I).

Die Auswertung der Sequenzdaten bestätigte, dass es sich beim Klon 8 um einen positiven Klon handelte. Alle gewünschten Sequenzabschnitte waren vorhanden und wurden in der richtigen Orientierung in das Hefegenom integriert (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden alle weiteren Experimente mit pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8 durchgeführt.

3.7 Kultivierung und Expression mit *K. lactis*

3.7.1 Optimierung der Proteinexpression

Vor der Proteinexpression mit *K. lactis* sollte die optimale Wachstumszeit mit der größtmöglichen Menge an exprimiertem und ins Medium ausgeschleusten MBP-IW ermittelt werden. Hierfür wurde von dem positiven Klon pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8 eine Kultur angesetzt, nach verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und analysiert. Die Abbildung 3.19 zeigt die Analyse der Proteinexpression der jeweiligen Proben nach der Konzentrierung (Methanol-Chloroform-Fällung, siehe 2.9.3) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung (16-88 h). In Abbildung 3.19 war deutlich zu erkennen, dass von den Hefezellen nach 16 h (OD_{600} von 37) lediglich eine sehr geringe Proteinexpression ausging. Erst nach 24 h (OD_{600} von 53) war die Proteinexpression und Ausschleusung von Proteinen in das Medium zu erkennen. Das Bandenmuster war zwischen 40 h (OD_{600} von 52) und 88 h (OD_{600} von 43) ähnlich und es wurden generell viele Proteine in das Medium ausgeschleust. Demnach war eine OD_{600} von über 40 notwendig, dass Proteine exprimiert und ausgeschleust wurden. Es waren einige markante Banden zwischen 43 kDa und 55 kDa zu erkennen, doch die exakte Zuordnung von MBP-IW war an Hand des SDS-Gels schwer zu treffen. Daher war eine chromatographische Reinigung zur Isolierung von MBP-IW aus dem Medium auf Grund der Vielzahl von exprimierten Proteinen notwendig. Für die Produktion wurde eine Kultivierungszeit von 64 h gewählt.

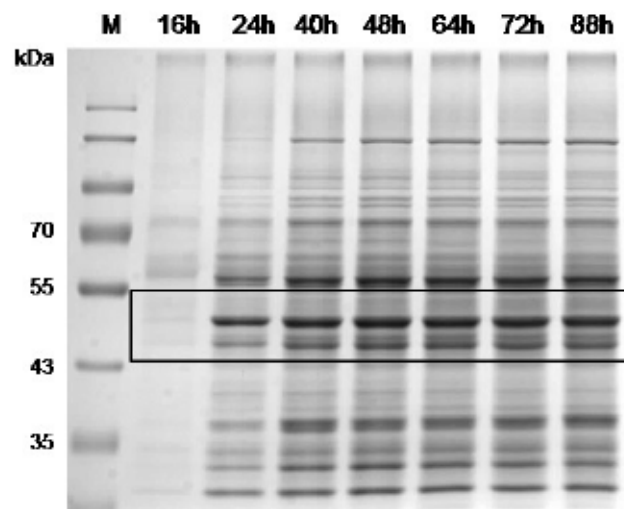


Abbildung 3.19: Elektrophoretische Auftrennung mittels 10 % SDS-Gel der Proben der Proteinexpression (konzentrierte Überstände) nach unterschiedlichen Wachstumszeiten; M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Wachstumszeiten von 16 h, 24 h, 40 h, 48 h, 64 h, 72 h und 88 h; Markierung zeigt den Bereich, indem MBP-IW vermutet wird

3.8 Proteinreinigung von MBP-IW aus *K. lactis*

3.8.1 Reinigung über Affinitätschromatographie

Die Reinigung mit der Affinitätschromatographie über die 1 ml MBPTrap HP Säule wurde, wie unter 2.10.1 beschrieben, durchgeführt. Als Auftrag diente der steril filtrierte Überstand von dem kultivierten Klon pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8 nach 64 h Wachstum. In der Abbildung 3.20 und Abbildung 3.21 (Zeitauflösung vergrößert) ist exemplarisch das Chromatogramm einer Reinigung des Überstands dargestellt. In den ersten 120 min wurde durch Verunreinigungen, Pufferbestandteile und andere Proteine eine hohe Absorption detektiert (Abbildung 3.20), welche während des Waschschriffs wieder sank.

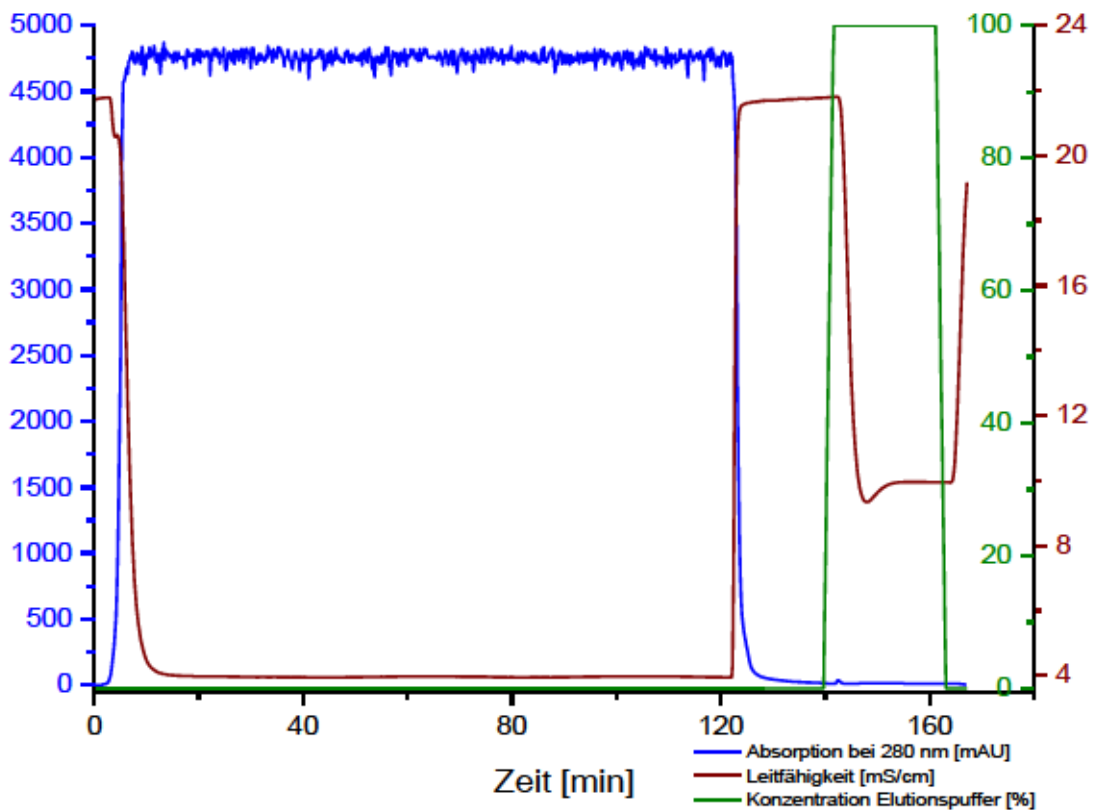


Abbildung 3.20: Exemplarisches Chromatogramm vom Reinigungsschritt (Affinitätschromatographie) mit von *K. lactis* produzierten Proteinen; UV-Detektion bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ [mAU] (blaue Linie); Die braune Linie gibt die Leitfähigkeit in mS/cm an; Die Konzentration des Elutionspuffers im Gradientenmischer [%] ist durch die grüne Linie gekennzeichnet

Nach Erhöhung der Konzentration vom Elutionspuffer eluierte das gebundene Protein ab etwa 142 min von der Säule (Abbildung 3.21). Dieser Peak war jedoch mit nur etwa 30 mAU sehr gering. Aus diesem Grund wurden die Elutionsfraktionen innerhalb des Peaks (Bereich zwischen den senkrecht gestrichelten Linien, drei Fraktionen à 500 µl) einzeln konzentriert (2.9.3), bevor diese elektrophoretisch mittels SDS-PAGE analysiert wurden.

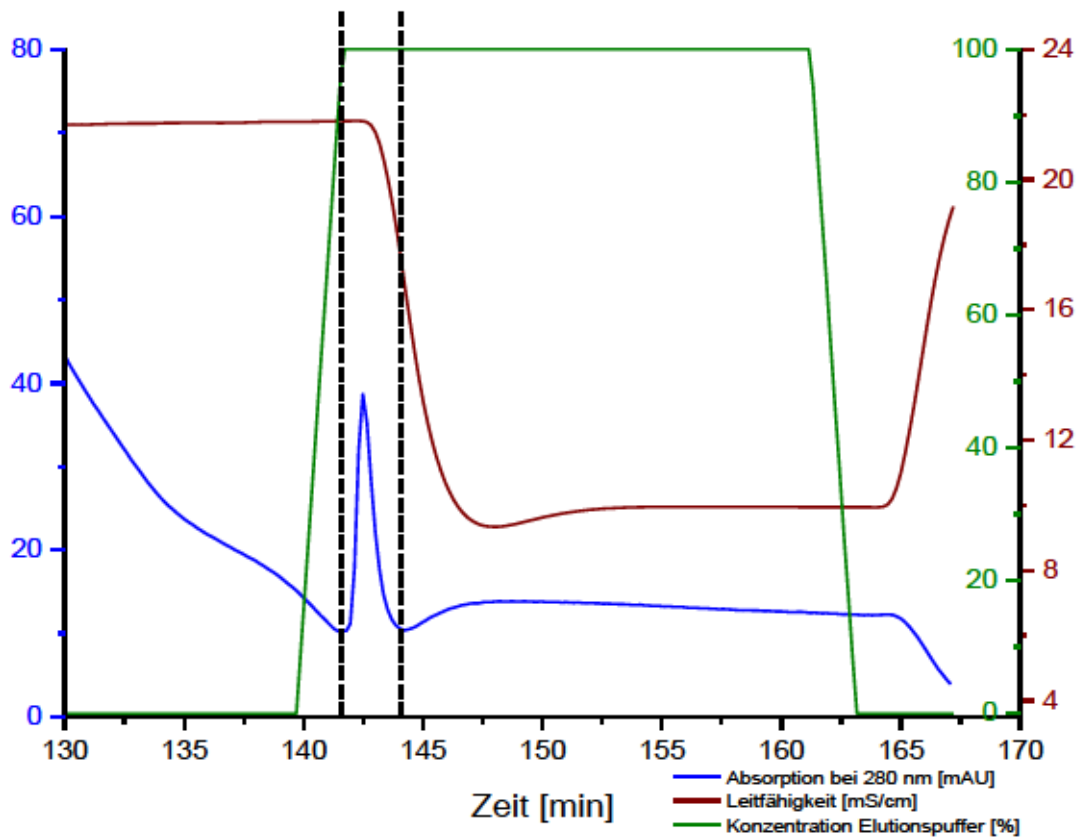


Abbildung 3.21: Exemplarisches Chromatogramm vom Reinigungsschritt (Affinitätschromatographie) mit von *K. lactis* produzierten Proteinen, zeitliche Auflösung der Elution vergrößert; UV-Detektion bei $\lambda = 280$ nm [mAU] (blaue Linie); Die braune Linie gibt die Leitfähigkeit in mS/cm an; Die Konzentration des Elutionspuffers im Gradientenmischer [%] ist durch die grüne Linie gekennzeichnet; Bereich zwischen den senkrecht gestrichelten Linien zeigt, in welchem Zeitbereich die Elutionsfraktionen gesammelt und einzeln analysiert wurden

Die Analyse der Fraktionen zeigte (Abbildung 3.22), dass im Überstand der Hefekultur verschiedene Proteine zwischen 43-55 kDa vorhanden waren (Auftrag, A), die auch im Durchfluss (D) zu sehen waren. An die Säule wurde demnach nur wenig Protein gebunden, was dadurch bestätigt wurde, dass in den Elutionsfraktionen keinerlei Proteine, selbst nach der Konzentrierung der Proben, detektiert werden konnten (F1-F3).

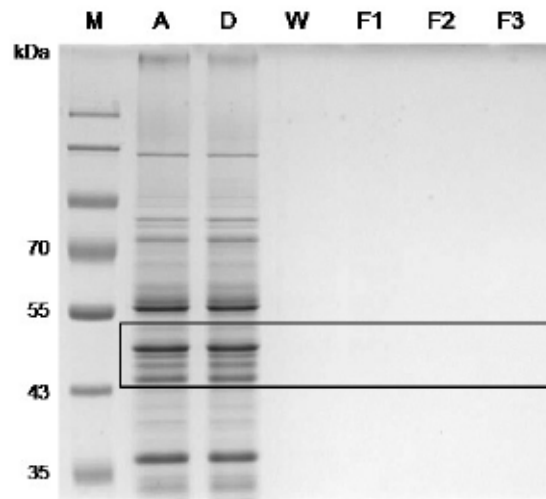


Abbildung 3.22: Elektrophoretische Auftrennung mittels 10 % SDS-Gel der konzentrierten Proben vom Reinigungsschritt (Affinitätschromatographie); M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, A: Auftrag, D: Durchfluss, W: Waschschrift, F1-F3: Fraktion 1-3; Markierung zeigt den Bereich, indem MBP-IW vermutet wird

3.8.2 Parameterprüfung

Da lediglich wenig Protein exprimiert wurde bzw. auch die Bindung des Proteins an die Säule schlecht war, sollten verschiedene Parameter geprüft werden (siehe 2.10.2), welche bei der Reinigung von MBP-IW generell oder auch speziell bei der Proteinexpression mit *E. coli* anders waren und demnach die Bindekapazität an die Säule begünstigen könnten.

Der pH der Probe, in dem die Proteine enthalten waren, sollte für eine entsprechende Bindung an die MBPTrap HP Säule über 7 liegen. Der pH-Wert des Mediums YPGal, welches zur Fermentation von *K. lactis* verwendet wurde, war 7,58 (bei 37 °C) bzw. 7,92 (bei 15 °C). Es konnte demnach davon ausgegangen werden, dass der pH-Wert des Mediums die Bindung des Proteins an die Säule nicht negativ beeinflusst.

Möglicherweise waren die Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Systemen *K. lactis* und *E. coli*, bezüglich der Proteinexpression und -reinigung, für die unterschiedliche Bindung des Proteins an die Säule verantwortlich. So könnten z.B. die

Pufferbestandteile bei der Reinigung von MBP-IW aus *E. coli* erforderlich für die Bindung an die Säule sein. Im Affinitätschromatographie-Säulenpuffer war z.B. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) enthalten, was eine leichte Auffaltung des Proteins zur Folge haben könnte und MBP unter Umständen besser zugänglich zum Säulenmaterial war. Daher wurde eine Kultur mit dem Klon pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8 angesetzt, der Überstand lyophilisiert und in Säulenpuffer resuspendiert. Diese Probe wurde dann auf die Säule geladen und eluiert (2.10.2). Im Chromatogramm war jedoch kein Peak zu erkennen und auch mittels SDS-PAGE wurden keine Proteine in den Elutionsfraktionen nach einer Methanol-Chloroform-Fällung detektiert (nicht gezeigt).

Um einen systematischen Fehler bei der Reinigung von den ins Medium ausgeschleusten Proteinen auszuschließen, wurde eine Reinigung von MBP ohne IW-Konstrukt durchgeführt. Der Klon pKLAC1-*malE* Klon 5 des Kontrollvektors (in *K. lactis* integriert) wurde kultiviert und der Überstand über die MBPTrap HP Säule gereinigt. Die analysierten Proben des Laufs mittels SDS-PAGE sind im Anhang dargestellt (siehe 8.2.2). Es zeigte sich, dass MBP von den Hefezellen exprimiert und ausgeschleust wurde. Das im Überstand befindliche Protein MBP konnte an die MBPTrap HP Säule gebunden werden und in den analysierten Elutionsfraktionen wurde ein sauberes Protein detektiert (Abbildung 8.4).

Wie bereits gezeigt, waren bei der Proteinexpression in *K. lactis* mehrere markante Proteine zwischen 43-55 kDa im Überstand vorhanden. Es wurden deshalb weitere Kulturen angesetzt und diese Überstände mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot analysiert, um die Proteinbande von MBP-IW detektieren zu können (2.10.2). Die Analyse dieser Proben ist im Anhang dargestellt (Abbildung 8.5). Bei den markanten Banden, welche im SDS-Gel detektiert wurden, handelte es sich nicht um das Protein MBP-IW. Es wurde zwar MBP-IW produziert, jedoch in einer geringen Menge, was der Grund für die schlechte Ausbeute bei der Proteinreinigung zu sein scheint (Details siehe Anhang Kapitel 8.2.2).

Abschließend ist festzustellen, dass es trotz verschiedener Ansätze nicht möglich war, MBP-IW aus *K. lactis* in ausreichender Menge zu produzieren bzw. an die Säule zu binden und zu reinigen.

3.9 Bestimmung des ACE-hemmenden Potentials von rIW

Das ACE-hemmende Potential von rIW wurde in verschiedenen Systemen *in vitro* und *ex vivo* getestet. Es wurde hierbei das lösliche ACE (aus der Kaninchenlunge und dem humanen Plasma) sowie das membrangebundene ACE (HUVECs) verwendet. In allen Assays wurde der ACE-hemmende Effekt von rIW mit denen von cIW und cDIW verglichen (siehe Kapitel 2.11).

3.9.1 Hemmpotential an ACE aus der Kaninchenlunge

Die ermittelten IC_{50} -Werte für die Hemmung des ACE aus der Kaninchenlunge lagen für rIW mit $1,72 \pm 0,12 \mu M$ und für cIW mit $1,91 \pm 0,29 \mu M$ im gleichen Konzentrationsbereich (Abbildung 3.23). Das Dipeptid cDIW zeigte hingegen keinen ACE-hemmenden Effekt.

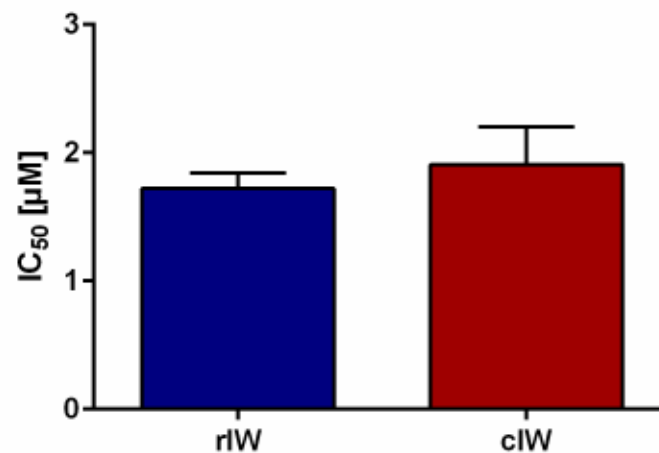


Abbildung 3.23: ACE-hemmendes Potential an ACE aus der Kaninchenlunge; Darstellung der IC_{50} -Werte von rIW und cIW; Mittelwert \pm SD, n = 3

3.9.2 Hemmpotential an ACE aus humanem Plasma

Die IC_{50} -Werte für das ACE aus humanem Plasma waren 3-4-mal höher, als die Werte für das ACE aus der Kaninchenlunge. Die IC_{50} -Werte für rIW und cIW waren mit $5,15 \pm 0,29 \mu M$ und $8,21 \pm 0,40 \mu M$ ebenfalls in einem ähnlichen Konzentrationsbereich (Abbildung 3.24). Für das Dipeptid cDIW konnte wiederum kein ACE-hemmender Effekt bestimmt werden.

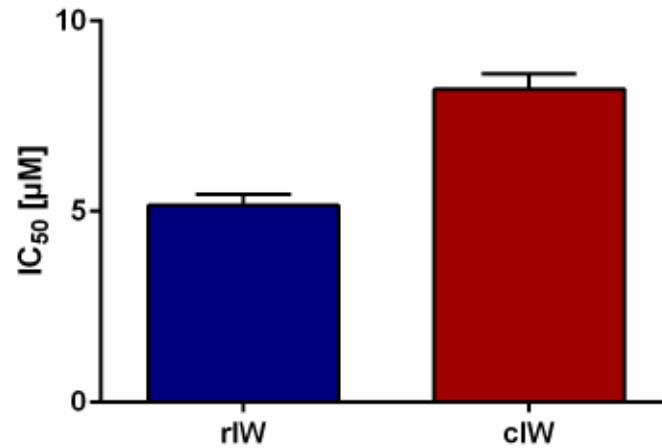


Abbildung 3.24: ACE-hemmendes Potential an ACE aus humanem Plasma; Darstellung der IC₅₀-Werte von rIW und cIW; Mittelwert \pm SD, n = 3

3.9.3 Hemmpotential an ACE aus HUVECs

Der Effekt auf das membrangebundene ACE wurde mittels HUVECs untersucht. In diesem System waren die IC₅₀-Werte generell etwa 2-3-mal höher, als die Werte welche mit humanem Plasma ACE ermittelt wurden. Das Peptid cIW hatte einen IC₅₀-Wert von $23,30 \pm 3,68 \mu\text{M}$. Für das rIW war ein geringerer IC₅₀-Wert, verglichen mit dem vom cIW, von $11,08 \pm 1,32 \mu\text{M}$ bestimmt worden. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($P = 0,06$) (Abbildung 3.25). Auch in diesem ACE-System wurde das Dipeptid cDIW analysiert. Wie bereits für die löslichen ACE-Systeme beschrieben, konnte auch hier kein ACE-hemmender Effekt gezeigt werden.

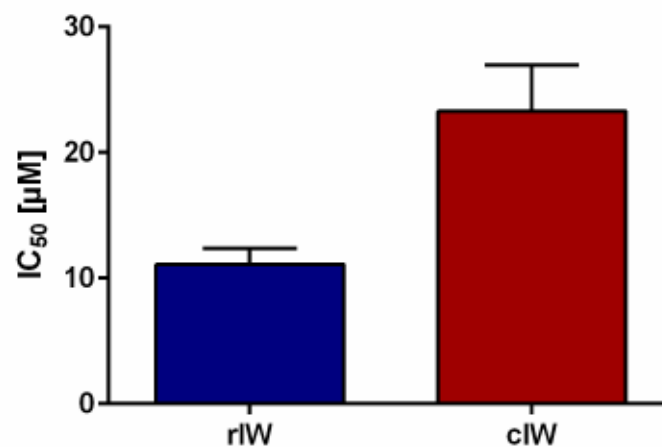


Abbildung 3.25: ACE-hemmendes Potential an ACE aus HUVECs; Darstellung der IC₅₀-Werte von rIW und cIW; Mittelwert \pm SD, n = 3

3.10 Bestimmung des ACE-hemmenden Potentials der Peptidmixe

Zusätzlich zu den getesteten ACE-hemmenden Effekten der verschiedenen IW-Proben, sollten auch andere Peptide, die in Lebensmittelproteinen enthalten sind, auf deren ACE-hemmendes Potential getestet werden. Als Proteinquellen dienten Molke, Soja und Reis. Nach der enzymatischen Hydrolyse wurden bioaktive tryptophan- und tyrosinhaltige Dipeptide detektiert und quantifiziert (in Tabelle 2.14 aufgelistet). Die Hydrolysate vom Soja- und Reisprotein enthielten mit neun verschiedenen Dipeptiden ein breiteres Spektrum an bioaktiven Peptiden im Vergleich zum Molkenprotein (lediglich drei verschiedene Dipeptide). Das Hydrolysat vom Sojaprotein besaß mit 452 μmol Dipeptid je g Hydrolysat/l den größten Anteil an bioaktiven Peptiden im Vergleich zum Hydrolysat vom Molke- und Reisprotein. Aber das Hydrolysat des Molkeproteins wies die größte Konzentration an IW auf (über 10-mal höher als bei den anderen beiden Proteinhydrolysaten). Die Peptidmixe wurden in dem Mengenverhältnis der quantifizierten tryptophan- und tyrosinhaltigen Dipeptide hergestellt und deren ACE-hemmendes Potential in verschiedenen ACE-Systemen getestet. Auch hier wurden das lösliche ACE (aus der Kaninchenlunge und dem humanen Plasma) und das membrangebundene ACE (HUVECs und Rattenaorta) betrachtet.

3.10.1 Hemmpotential der Peptidmixe an ACE aus der Kaninchenlunge

Der IC_{50} -Wert vom Peptidmix Molke war $16,60 \pm 2,59 \text{ mg/l}$. Die IC_{50} -Werte für die Peptidmixe von Reis und Soja waren mit $78,30 \pm 9,95 \text{ mg/l}$ und $86,63 \pm 12,87 \text{ mg/l}$ im Vergleich zum Molke Peptidmix signifikant höher ($P \leq 0,001$, Abbildung 3.26).

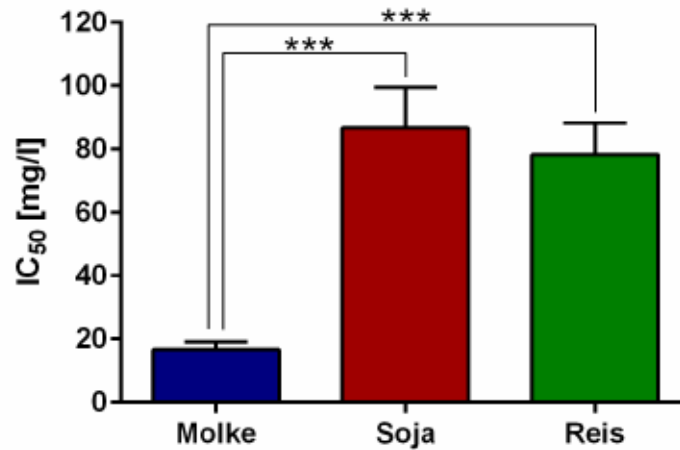


Abbildung 3.26: ACE-hemmendes Potential der Peptidmixe an ACE aus der Kaninchenlunge; Darstellung der IC₅₀-Werte der Peptidmixe von Molke, Soja und Reis; *** $P \leq 0,001$, Mittelwert \pm SD, $n = 3$

3.10.2 Hemmpotential der Peptidmixe an ACE aus humanem Plasma

Generell waren die IC₅₀-Werte, welche für das humane Plasma ACE bestimmt wurden, im Vergleich zu den ermittelten Werten für das ACE aus der Kaninchenlunge deutlich höher (Abbildung 3.27). Die Konzentrationen, welche nötig waren, um den gleichen Effekt wie mit dem ACE aus der Kaninchenlunge zu erreichen, waren für den Peptidmix Soja ($218,53 \pm 30,02$ mg/l) und den Peptidmix Reis ($282,04 \pm 18,51$ mg/l) etwa 3-mal höher. Doch besonders für den Peptidmix Molke war der Unterschied groß. Der IC₅₀-Wert war mit $112,43 \pm 7,33$ mg/l fast 7-mal höher, als der IC₅₀-Wert für ACE aus der Kaninchenlunge. Dennoch zeigte auch hier der Peptidmix von Molke das stärkste ACE-hemmende Potential. Im Unterschied zum Hemmpotential an ACE aus der Kaninchenlunge zeigte sich im humanen Plasma Assay auch ein signifikanter Unterschied des ACE-hemmenden Effekts zwischen den Peptidmixen von Soja und Reis (Abbildung 3.27).

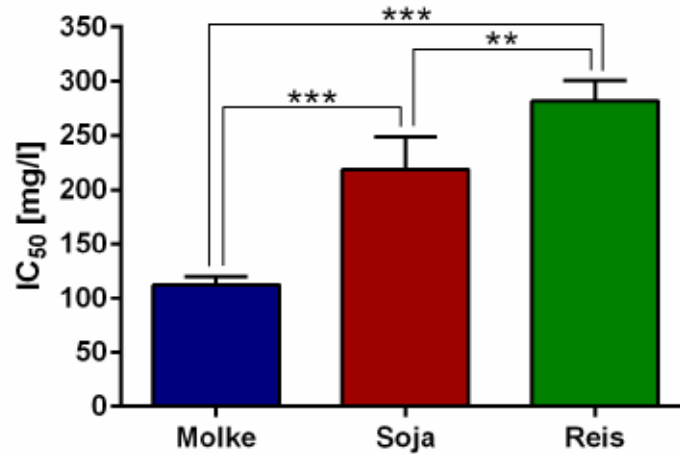


Abbildung 3.27: ACE-hemmendes Potential der Peptidmische an ACE aus humanem Plasma; Darstellung der IC₅₀-Werte der Peptidmische von Molke, Soja und Reis; ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, Mittelwert \pm SD, $n = 3-8$

3.10.3 Hemmpotential der Peptidmische an ACE aus HUVECs

Die IC₅₀-Werte welche im Assay mit HUVECs ermittelt wurden, waren fast 4-5-mal geringer, als die IC₅₀-Werte für den Assay mit humanem Plasma ACE. Der Peptidmix Molke zeigte mit einem IC₅₀-Wert von $26,17 \pm 3,69$ mg/l das höchste ACE-hemmende Potential, verglichen mit den 2-3-fach höheren IC₅₀-Werten für die Peptidmische Soja ($46,31 \pm 5,38$ mg/l) und Reis ($76,58 \pm 11,13$ mg/l). Auch im Assay mit HUVECs war die ACE-Hemmung mit dem Soja Peptidmix signifikant besser ($P \leq 0,001$), als mit dem Reis Peptidmix (Abbildung 3.28).

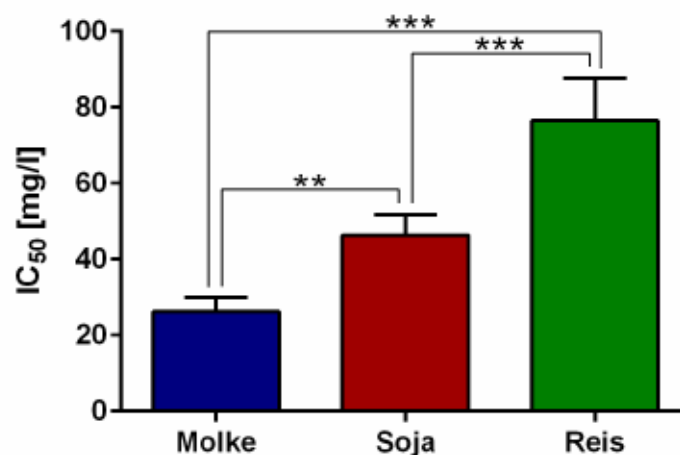


Abbildung 3.28: ACE-hemmendes Potential der Peptidmische an ACE aus HUVECs; Darstellung der IC₅₀-Werte der Peptidmische von Molke, Soja und Reis; ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, Mittelwert \pm SD, $n = 3-7$

3.10.4 Hemmpotential der Peptidmixture an ACE aus der Rattenaorta

Der Assay mit der Rattenaorta wurde verwendet, um den ACE-hemmenden Effekt der verschiedenen Peptidmixture auf ein komplexeres membrangebundenes ACE-System darzustellen. Wie bereits in den anderen ACE-Assays zeigte auch hier der Molke Peptidmix mit einem IC_{50} -Wert von $75,37 \pm 19,91$ mg/l den stärksten hemmenden Effekt. Jedoch war dieser, verglichen mit dem Assay in HUVECs, deutlich schwächer. Die IC_{50} -Werte der Peptidmixture von Soja und Reis waren mit $128,63 \pm 32,47$ mg/l und $144,77 \pm 18,77$ mg/l signifikant höher als für den Peptidmix Molke (Abbildung 3.29).

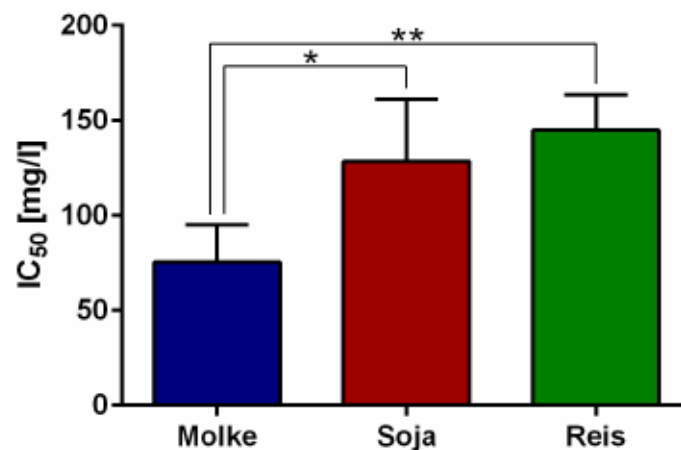


Abbildung 3.29: ACE-hemmendes Potential der Peptidmixture an ACE aus Rattenaorta; Darstellung der IC_{50} -Werte der Peptidmixture von Molke, Soja und Reis; * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, Mittelwert \pm SD, $n = 5$

4 Diskussion

4.1 Produktion vom rekombinanten IW

Bioaktive Peptide bieten vielfältige Möglichkeiten im Hinblick auf ihre Verwendung als Bestandteil eines funktionellen Lebensmittels. Es gibt verschiedene Methoden zur Generierung von bioaktiven Peptiden, aber vor allem wird die enzymatische Hydrolyse von Gesamtproteinen angewandt (Hernández-Ledesma et al., 2011). Während dieses Prozesses entstehen eine Vielzahl an Aminosäuren, Peptiden unterschiedlicher Größe und restliches Gesamtprotein. Besonders eine Isolation von kleinen Peptiden aus dieser Vielzahl von Bestandteilen ist schwierig (Losacco et al., 2007). Es gibt verschiedene Techniken, wie z.B. eine Membranfiltration oder Extraktion, um sogar einzelne Peptide zu isolieren, was jedoch zeit- und kostenintensiv ist. Ein weiteres Problem der enzymatischen Hydrolyse von Proteinen ist, dass die gewünschte Peptidsequenz meist nur in geringer Anzahl in dem Ausgangsprotein vorhanden ist. Somit wäre die Menge an Peptid bereits auf diese Weise stark limitiert. Das Peptid IW z.B. liegt nur 1-2-mal in der Sequenz des bovinen α -Lactalbumin (Sienkiewicz, 1981), Wakame (Sato et al., 2002) oder Lachsproteinen (Darewicz et al., 2014) vor. Aus diesem Grund müsste eine große Menge an Ausgangsprotein zur Verfügung stehen, um eine ausreichende Menge an IW zu produzieren und dieses in Lebensmitteln einbringen zu können, was allerdings wieder die Kosten erhöht. Weiterhin wurde für eine Produktion von Peptiden bereits die chemische Synthese beschrieben, mit der eine Limitierung durch vorgegebene Proteinsequenzen hinfällig wäre. Auf Grund der rechtlichen Situation in Europa stellt diese Methode jedoch keine Alternative dar, da Peptide, welche chemisch synthetisiert worden sind, nicht in Lebensmitteln eingebracht werden dürfen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine alternative und innovative Strategie zur Produktion von bioaktiven Peptiden zu entwickeln, bei denen die Produkte anschließend als funktionelles Lebensmittel verwendet werden können.

Eine verbreitete und relativ günstige Methode zur Produktion von Proteinen mit hoher Ausbeute ist die Expression von rekombinanten Proteinen durch Mikroorganismen. Da es bereits Substanzen gibt, welche gentechnisch hergestellt und in Lebensmitteln eingesetzt werden (Flamm, 1991; Landry et al., 2003; Olempska-Beer et al., 2006), scheint dieses Verfahren geeignet zu sein. Dennoch ist auch hierbei die Schwierigkeit, kleine Peptide oder gar Dipeptide herzustellen und diese vom Expressionssystem zu isolieren. Allerdings konnten verschiedene Studien zeigen, dass ACE-hemmende Peptide mit Hilfe von

rekombinanten Proteinen hergestellt werden können (Jeong et al., 2007; Liu et al., 2007; Losacco et al., 2007). Als erfolgreich erwies sich z.B. die Herstellung eines Fusionsproteins mit den gewünschten Peptiden und dem Affinitätstag Glutathion-S-Transferase. Diese Proteine wurden exprimiert und anschließend enzymatisch hydrolysiert, um die ACE-hemmenden Peptide SLVYPFPGPI, NIPPLTQTPV und DKIHPF vom Gesamtprotein isolieren zu können (Losacco et al., 2007). Ein anderes Verfahren zur Produktion von kleinen Peptiden ist, dass die Sequenz der bioaktiven Peptide repetitiv eingesetzt wird (Jeong et al., 2007). Somit wird ein größeres und stabileres rekombinantes Protein exprimiert, bei dem die für das ACE-hemmende Peptid codierende Sequenz mehrfach im Gen enthalten ist. Damit wird verhindert, dass es zu einem unerwünschten Abbau kommt, wie das für Peptide mit geringem Molekulargewicht im bakteriellen Expressionssystem beschrieben ist (Liu et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Produktion des ACE-hemmenden Dipeptids IW, basierend auf rekombinanter DNA-Technologie, entwickelt. Hierfür wurden zunächst Experimente mit dem am häufigsten verwendeten Wirtsorganismus *E. coli* durchgeführt. Neben den vielen Systemen, welche für eine Produktion von heterologen Proteinen zur Verfügung stehen, sind besonders die schnellen Wachstums- und Produktionsraten mit preiswerten Medien, die gut charakterisierte Genetik und die Verfügbarkeit einer großen Auswahl von Klonierungsvektoren und mutierten Wirtsstämmen von *E. coli* Gründe dafür, dass dieser Wirtsorganismus so attraktiv für die Verwendung zur rekombinanten Proteinexpression ist (Baneyx, 1999). Durch die bereits vorhandenen Studien, welche eine Produktion von Peptiden in Mikroorganismen zeigten, konnte bei der Entwicklung der Methode auf vielfältige Erfahrungen zurückgegriffen werden. Da es sich lediglich um die Produktion eines Dipeptids handelte und die Isolierung aus einer Vielzahl von exprimierten Proteinen des Expressionssystems nicht einfach ist, wurde ein repetitives IW-Konstrukt entworfen, welches insgesamt 16-mal IW enthielt. Um eine bessere Herstellung des Konstrukts bereits bei der synthetischen DNA-Synthese gewährleisten zu können, wurden zwischen den repetitiven IW-Sequenzen zwei unterschiedliche Heptapeptid-Spacer eingebaut. Somit war die DNA-Sequenz 264 bp groß und codierte für ein etwa 10 kDa großes Protein. Größere Proteine sind meist stabiler gegenüber Proteasen und im Vergleich zu Dipeptiden auch einfacher vom Expressionssystem zu isolieren. Nachteilig an einer repetitiven Sequenz ist jedoch, dass diese für kein natürlich vorkommendes Protein codiert. Unter anderem können solch repetitive Elemente die Stabilität des Gens in seinem Wirtsorganismus beeinflussen (Gustafsson et al., 2004). Durch diese genomische Instabilität sind Umlagerungen zwischen den repetitiven Sequenzelementen möglich, welche sich entweder in einer Deletion oder Duplikation vom

genetischen Material äußern können. Diese durch genomische Instabilität verursachten Neuordnungen können sowohl Prokaryoten als auch Eukaryoten betreffen (Bzymek & Lovett, 2001). Für einige Mikroorganismen ist eine Expression von stark repetitiven Proteinen deshalb problematisch und es kann dazu führen, dass das Protein nicht in gewünschter Menge oder im schlechtesten Fall sogar überhaupt nicht exprimiert werden kann. Im Hinblick auf eine möglichst unkomplizierte Proteinexpression, wurde zudem darauf geachtet, dass die gesamte DNA-Sequenz nach deren Proteinbiosynthese keinerlei Cystein enthielt. Cystein ist eine sehr reaktionsfreudige Aminosäure und bildet Disulfidbrückenbindungen aus (Roth et al., 2017). In Eukaryoten werden diese bei der Expression im ER gebildet. Bakterien hingegen haben kein ER und die Bildung findet im Periplasma statt. Aus diesem Grund bilden rekombinante Proteine, deren Translation im Cytosol der Bakterien stattfindet, keine stabilen Disulfidbrückenbindungen aus (Missiakas & Raina, 1997; Fernandez & de Lorenzo, 2001). Die Stabilität des Proteins wird dadurch vermindert, was zu einem ungefalteten Protein führen kann (Missiakas & Raina, 1997). So kann es bei der Überexpression von heterologen Proteinen im Cytoplasma von *E. coli* zu ungefalteten oder falsch gefalteten Proteinen kommen, welche oftmals in unlöslichen Einschlusskörpern (Inclusion Bodies) eingeschlossen werden (Baneyx, 1999; Carrio & Villaverde, 2005). Der Abbau von Proteinen oder die Bildung von Inclusion Bodies hat eine reduzierte Ausbeute des gewünschten Proteins zur Folge bzw. die anschließende Reinigung der Proteine ist mit zusätzlichen Arbeitsschritten verbunden und somit aufwendiger, was zu einer Kosten- und Zeitintensivierung führt (Singh et al., 2015). Eine Strategie, um die Löslichkeit von rekombinanten Proteinen zu steigern, ist die Fusion mit einem gut löslichen Fusionspartner (Hammarström et al., 2002). Geeignete Fusionstags sind z.B. Thioredoxin, Glutathion-S-Transferase oder MBP (Kapust & Waugh, 1999; Hammarström et al., 2002). Besonders der Fusionspartner MBP (42 kDa) schien außerordentlich wirksam zu sein, um die Löslichkeit von verschiedenen Proteinen zu steigern (Kapust & Waugh, 1999; Waugh, 2016). Auch hinsichtlich der Proteinreinigung ist MBP günstig, da es sich hierbei um einen Affinitätstag handelt und das Fusionsprotein somit über eine Affinitätschromatographie gereinigt werden kann. Ein weiterer Nutzen von MBP ist, dass es bei diesem Reinigungsverfahren mit dem ungiftigen Disaccharid Maltose wieder von der Säule eluiert werden kann. Dies bietet einen Vorteil im Hinblick auf die Anwendung des im rekombinanten Protein enthaltenden IW in Lebensmitteln. Es zeigte sich bei der Herstellung des Proteins MBP-IW jedoch, dass lediglich eine Fusion an MBP nicht ausreichte, um das Zielprotein zu einem großen Anteil löslich zu produzieren. Der Großteil des Proteins wurde nämlich unlöslich in Inclusion Bodies exprimiert. Ein Lösungsansatz hierfür ist, dass die Temperatur während der Kultivierung verringert wird, um die Löslichkeit des Zielproteins zu erhöhen (Baneyx, 1999). Allerdings ist diese Strategie nicht bei jedem

Protein erfolgsversprechend (Hammarström et al., 2002). Anhand des Proteins MBP-IW zeigte sich aber, dass eine Verringerung der Temperatur während der Kultivierung von 37 °C auf 30 °C bereits ein besseres Verhältnis von löslich produziertem MBP-IW zu unlöslich produziertem MBP-IW zur Folge hatte. Bei einer Kultivierungstemperatur von 25 °C war dieses Verhältnis nochmal deutlich verbessert. Für eine möglichst hohe Ausbeute an löslichem MBP-IW während der Proteinbiosynthese wurde aus diesem Grund, neben der Fusion mit MBP, eine Kultivierungstemperatur von 25 °C gewählt.

Von den *E. coli*-Zellen wurde nach deren Zellaufschluss das löslich exprimierte MBP-IW chromatographisch gereinigt. Wider Erwarten ergab sich nach der Reinigung mit der Affinitätschromatographie keine annehmbare Reinheit des Proteins. Aus diesem Grund wurde eine weitere Reinigungsmethode und zwar die Größenausschlusschromatographie angeschlossen, um das Protein in gewünschter Reinheit vorliegen zu haben. Die Ausbeute vom so gereinigten Protein MBP-IW betrug pro 1 g *E. coli* Feuchtmasse 0,52 mg bzw. 1,6 mg/l. Dies scheint eine geringe Ausbeute zu sein, beim Vergleich mit anderen Studien, in denen MBP-Fusionsproteine mit einer Ausbeute von 36-100 mg/l exprimiert werden konnten (Song et al., 2011; Walper et al., 2014). Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass es sich in diesen Studien um natürliche Proteine handelte, welche exprimiert wurden. Die geringere Ausbeute von MBP-IW könnte auf die Sequenz des rekombinanten IW-Proteins zurückzuführen sein, da das entworfene IW-Konstrukt sehr repetitiv ist und für kein natürliches Protein codiert.

Nach der Reinigung des Proteins MBP-IW sollte das Affinitätstag MBP über die spezifische Schnittstelle zwischen diesem und dem IW-Konstrukt mit der Protease Faktor Xa getrennt werden. Es zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit, dass trotz unterschiedlicher Bedingungen keine Abtrennung erreicht werden konnte. Ein denkbarer Grund dafür könnte sein, dass das gefaltete Protein die Bindungsstelle für Faktor Xa sterisch behindert. Da das Protein jedoch nach den beiden Reinigungsschritten in ausreichender Reinheit vorlag, wurde das gesamte Protein hydrolysiert, ohne zuvor eine Trennung vom MBP durchzuführen. Dies geschah mittels α -Chymotrypsin (einstufiger Enzymverdau), weil die Hydrolyse mit einem weiteren Enzym (α -Chymotrypsin und Thermolysin; zweistufiger Enzymverdau) keinen Vorteil in der Ausbeute von rIW zeigte. Von 0,52 mg MBP-IW, welches pro 1 g *E. coli*-Zellen gereinigt werden konnte, wurden nach der Hydrolyse und Isolation 14 μ g rIW gewonnen. Somit lag die Ausbeute für rIW bei 28 %, was als Basis für die erste biotechnologische Produktion von rIW mit einer hohen Reinheit von ≥ 96 % positiv zu werten ist. Um die Expression von MBP-IW und die Ausbeute an rIW zu erhöhen, müsste das Verfahren weiter optimiert werden, um es industriell einsetzen zu können. Hier wäre neben einer Prüfung von weiteren Wachstumsbedingungen auch generell die Veränderung der DNA-Sequenz

möglich, um die Expression zu erhöhen. Interessant wäre vor allem, wie sich eine veränderte Gesamtproteinlänge des IW-Konstrukts oder verschiedene Spacer (unterschiedliche Längen oder Peptidsequenzen) zwischen den repetitiven IW-Dipeptiden auf die Expression von MBP-IW auswirken. Unter Umständen wäre das Protein leichter von *E. coli* zu exprimieren bzw. könnte durch eine veränderte Tertiärstruktur besser an die Affinitätssäule bei der Reinigung binden.

Mit Hilfe von drei unterschiedlichen Verfahren, in Form von RP-HPLC, LC-ESI-MS/MS und der N-terminalen Derivatisierung des Peptids, konnte das produzierte Dipeptid auch zweifelsfrei als IW mit einer Reinheit von $\geq 96\%$ identifiziert werden.

Das Besondere an der entwickelten Methode zur Herstellung des Dipeptids IW mittels rekombinanter DNA-Technologie ist, dass es auch möglich wäre, andere ACE-hemmende Peptide auf diese Weise zu produzieren. Hierfür müsste lediglich eine Anpassung der repetitiven DNA-Sequenz vorgenommen werden und diese dann in den Expressionsvektor kloniert werden.

Neben *E. coli* wurde noch ein weiteres System zur Expression von MBP-IW angewandt. Hierfür wurde der eukaryotische Organismus Hefe und im speziellen die Art *K. lactis* als Wirtszelle verwendet. Mit diesem System konnten die möglichen Nachteile des Expressionssystems *E. coli* (z.B. die unzureichende Ausbildung von posttranslationalen Modifikationen oder eine korrekte Proteinfaltung) bei der Proteinexpression umgangen werden (Idiris et al., 2010). Dadurch sollte unter anderem der Bildung von Inclusion Bodies entgegen gewirkt werden und generell geprüft werden, ob die Ausbeute an MBP-IW womöglich mit diesem Expressionssystem erhöht werden konnte. Allgemein sind die Besonderheiten des Expressionssystems Hefe, dass eine kosteneffiziente heterologe Proteinexpression in hoher Ausbeute möglich ist. Während der Proteinexpression können posttranslationale Modifikationen von höheren eukaryotischen Zellen nachempfunden werden. Das bedeutet, dass Proteine hergestellt werden, bei denen z.B. Glykosylierungen, Phosphorylierungen oder etwa eine korrekte Faltung (unter anderem Disulfidbrückenbindungen) entscheidend sind (Spohner et al., 2016). Im Besonderen ist *K. lactis* einfach genetisch zu manipulieren, kann im günstigen Standardmedium kultiviert werden und ist auch sehr effizient bei der Expression von heterologen Proteinen verwendbar (van Ooyen et al., 2006). Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete *K. lactis*-Stamm GG799 zeichnet sich durch eine gute Proteinbiosynthese mit sekretorischen Fähigkeiten der Proteine ins Medium aus (van Ooyen et al., 2006). Darüber hinaus besitzen von *K. lactis* produzierte Enzyme von der FDA den sogenannten GRAS-Status (*Generally Recognized As Safe*, allgemein als sicher anerkannt), der die Unbedenklichkeit eines

Stoffes als Lebensmittelzusatzstoff kennzeichnet (van Ooyen et al., 2006; Spohner et al., 2016). Das wäre vor allem im Hinblick auf das produzierte IW für die Verwendung als funktionelles Lebensmittel äußerst interessant, denn es gibt bereits Proteine, welche mit *K. lactis* produziert werden und in vielen Lebensmitteln eingesetzt werden (Spohner et al., 2016). Bei der Reinigung des Proteins MBP-IW zeigte sich jedoch, dass das Protein selbst nach verschiedenen Optimierungsversuchen nicht in ausreichender Menge exprimiert und an die Affinitätssäule gebunden werden konnte. Es scheint, dass die Hefezellen das Protein MBP-IW nicht gut exprimieren und ins Medium ausschleusen konnten. Auch hier könnte, wie bereits diskutiert, die repetitive Proteinsequenz von MBP-IW eine entscheidende Rolle spielen. Somit wurde mit diesem System die Ausbeute des Proteins nicht erhöht und für die weitere Verwendung zur Expression des IW-Konstrukts verworfen.

4.2 ACE-hemmender Effekt

4.2.1 Rekombinantes IW

Das Hemmvermögen vom produzierten rIW auf das ACE wurde in verschiedenen Systemen untersucht. Um das ACE-hemmende Potential von rIW und cIW miteinander vergleichen zu können, wurde dieses mit drei unterschiedlichen ACE-Systemen bestimmt. Die Verteilung der ACE-Aktivität beim Menschen ist sehr komplex. Neben dem löslichen, zirkulierenden Plasma-ACE gibt es auch membrangebundenes ACE, was eine heterogene ACE-Aktivität in den unterschiedlichen Geweben bedingt (Baudin, 2002; Paul et al., 2006). Wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben, wird dem lokalen ACE, im Gegensatz zum systemischen ACE, im besonderem Maße eine Beteiligung am vaskulären Remodeling zugesprochen (Paul et al., 2006; Wu et al., 2015). Um einer Limitierung durch nur ein verwendetes System entgegenzuwirken, wurde neben dem in der Literatur am häufigsten genutzten ACE aus der Kaninchenlunge auch ACE von humaner Quelle verwendet. Das ACE-hemmende Potential wurde demnach zusätzlich mit humanem Plasma-ACE (lösliches ACE) und auch mit einem membrangebundenem ACE-System (HUVEC) bestimmt.

Neben einem Vergleich vom rIW und cIW sollte noch eine weitere IW-Form mit einbezogen werden, nämlich das chemisch produzierte kommerziell erwerbliche D-IW (cDIW). Natürlich vorkommende Proteine bestehen im Allgemeinen aus Aminosäuren der L-Form, die D-Form liegt nicht vor. Es ist bekannt, dass D- und L-Aminosäuren unterschiedlich biologisch aktiv sein können, was für pharmazeutische oder toxikologische Anwendungen wichtig ist (Dołowy & Pyka, 2014). So zeigten sich z.B. nach der intracerebroventrikulären Injektion von L- oder D-Cystein unterschiedliche Effekte bei neugeborenen Küken mit isolationsinduziertem Stress. Beide Aminosäuren zeigten eine sedative Wirkung aber die

Injektion von D-Cystein bewirkte bei den Küken auch ein abnormales Verhalten und kann demnach schädlich sein (Yamane et al., 2009). Weiterhin wurde beschrieben, dass Peptide oder Substanzen, die zum Teil oder vollständig aus D-Aminosäuren bestehen, stabiler gegenüber proteolytischen Aktivitäten sind, als solche, die lediglich aus L-Aminosäuren bestehen (van Regenmortel & Muller, 1998; Tsume et al., 2014). Studien aus unserem Institut zeigten, dass die L-Form von IW eine limitierte Stabilität im humanen Plasma und in HUVECs, aufgrund des Abbaus durch Proteasen, aufweist (Khedr et al., 2015, 2017). Es ist vorstellbar, dass die D-Form stabiler gegenüber Plasma-Proteasen ist, sodass hier neben der L-Form von IW auch die D-Form (cDIW) auf deren ACE-Hemmung in unterschiedlichen Systemen untersucht wurde.

Dabei konnte gezeigt werden, dass cDIW bei keinem der verwendeten ACE-Systeme einen ACE-hemmenden Effekt zeigte.

Die IC_{50} -Werte für das ACE aus der Kaninchenlunge waren mit $1,72 \pm 0,12 \mu\text{M}$ (rIW) und $1,91 \pm 0,29 \mu\text{M}$ (cIW) im Vergleich zu den anderen ACE-Quellen am geringsten (Tabelle 4.1). Mit dem ACE aus humanem Plasma wurden etwa 3-4-fach höhere IC_{50} -Werte für die beiden IWs bestimmt. Diese Unterschiede in den absoluten Werten zwischen den beiden löslichen ACE-Systemen könnten durch den hohen Plasmaproteingehalt erklärt werden. Das ACE aus der Kaninchenlunge lag als isoliertes Enzym vor. Doch in der Plasmaprobe könnte die große Menge an Proteinen zu einer ausgeprägten Proteinbindung des Dipeptids führen. Weiterhin muss beachtet werden, dass Plasma verschiedene Peptidasen und Proteasen neben dem ACE beinhaltet, welche IW abbauen könnten und damit den ACE-hemmenden Effekt verringern würden. Für das membrangebundene ACE (HUVECs) waren noch höhere Konzentrationen an cIW bzw. rIW nötig, um einen gleichen Hemmeffekt zu erreichen. Zwar wurde ebenfalls humanes ACE gehemmt, doch der Unterschied zum Plasma-ACE könnte auch hier mit der Stabilität von IW erklärt werden, da die Proteaseaktivität in beiden Assays vermutlich unterschiedlich ist. Zusätzlich ist das ACE in HUVECs membrangebunden und liegt erst durch die Spaltung der Membranbindung an den Endothelzellen in löslicher Form vor (Costerousse et al., 1997; Eyries et al., 2001). Durch diese Spaltung könnte sich die Tertiärstruktur des ACE ändern, was möglicherweise einen Unterschied im hemmenden Potential zwischen ACE gebunden an HUVECs und freiem ACE im Plasma erklärt. Im Assay mit ACE aus HUVECs wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den IC_{50} -Werten von rIW ($11,08 \pm 1,32 \mu\text{M}$) und cIW ($23,30 \pm 3,68 \mu\text{M}$) bestimmt (Tabelle 4.1), der jedoch nicht signifikant war ($P = 0,06$). Dieser Unterschied ist aktuell nicht erklärbar, es könnte jedoch sein, dass die Reinheit des rIW ($\geq 96 \%$) höher ist, als vom cIW, womit auch eine mögliche Wirkung von Nebenprodukten ausgeschlossen werden könnte.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass zwischen rIW und cIW bezüglich des ACE-hemmenden Potentials keine Unterschiede vorlagen (Tabelle 4.1) und eine biotechnologische Produktion des funktionellen IWs realisiert werden konnte.

Tabelle 4.1: IC₅₀-Werte von rIW und cIW in den verschiedenen ACE-Systemen im Überblick

ACE-Quelle	IC ₅₀ -Werte [µM]	
	rIW	cIW
ACE aus Kaninchenlunge	1,72 ± 0,12	1,91 ± 0,29
ACE aus humanem Plasma	5,15 ± 0,29	8,21 ± 0,40
ACE aus HUVECs	11,08 ± 1,32	23,30 ± 3,68

Der IC₅₀-Wert ist als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben, n = 3

4.2.2 Peptidmixe

Neben dem isolierten Dipeptid IW, sollten im Rahmen dieser Arbeit noch Peptidmischungen mit anderen Peptiden hinsichtlich ihrer ACE-Hemmung untersucht werden. Zusätzlich zum Molkenprotein, in dem α -Lactalbumin und somit IW enthalten ist, wurden alternativ auch zwei pflanzliche Proteine (Soja- und Reisprotein) nach der Hydrolyse auf ihr ACE-hemmendes Potential getestet. Aufgrund von Laktoseintoleranz oder der stetig zunehmenden Zahl von Menschen mit einem vegetarischen bzw. veganen Lebensstil (Leitzmann, 2014), die Tier- und/oder Milchprodukte vermeiden, erscheint es wichtig, alternative Proteinquellen wie eben Soja und Reis zu betrachten. Oftmals wird das komplette Hydrolysat für ACE-hemmende Studien eingesetzt. Um jedoch auszuschließen, dass Verunreinigungen der Proteine oder Enzyme, welche für die Hydrolyse genutzt wurden, einen Einfluss auf das ACE-hemmende Potential haben, wurde hier nicht das komplette Hydrolysat genutzt. Zudem wurde auch darauf verzichtet, die bioaktiven Peptide einzeln zu testen, um eine eventuelle Konkurrenz der verschiedenen Peptide bei der Bindung an das ACE berücksichtigen zu können. Aus diesem Grund wurden drei Peptidmixe auf Grundlage der nach der Hydrolyse identifizierten und quantifizierten bioaktiven tryptophan- und tyrosinhaltigen Dipeptide hergestellt und diese Peptidmixe auf ihr ACE-hemmendes Potential untersucht (Michelke et al., 2017). Die absolute Menge der identifizierten bioaktiven Peptide war im Sojaprotein am höchsten. Es ist jedoch anzumerken, dass generell der Unterschied zwischen den einzelnen Peptidmischen gering war und die Menge an bioaktiven Peptiden zwischen 413 und 452 µmol in 1 g Hydrolysat/l lag (Tabelle 4.2). Ein entscheidender Unterschied war die Tatsache, dass der Peptidmix Molke einen hohen Anteil an tryptophanhaltigen Dipeptiden, vor allem aber eine über 10-fach höhere Konzentration des potenten ACE-hemmenden Dipeptids IW im Vergleich zu

den Peptidmischen von Soja und Reis aufweist. Doch neben IW sind noch andere Peptide in der Literatur beschrieben, welche ACE-hemmend wirken und auch in den Proteinen von Soja und Reis nach der Hydrolyse enthalten sind. Dessen ungeachtet ist festzustellen, dass von den enthaltenen quantifizierten tryptophan- und tyrosinhaltigen Peptiden das Dipeptid IW den stärksten ACE-hemmenden Effekt zeigt (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Zusammensetzung der bioaktiven tryptophan- und tyrosinhaltigen Dipeptide der Hydrolysate vom Molke-, Soja- und Reisprotein sowie deren ACE-Hemmung *in vitro*

Dipeptid	μmol Dipeptid in 1 g Hydrolysat/l			IC ₅₀ (μM)
	Molke	Soja	Reis	
AW		35	36	10 (Cheung et al., 1980)
EW		17	9	26,2 (Khedr et al., 2015)
IW	253	24	12	0,7 (Martin et al., 2008)
LW		154	41	23,6 (Sato et al., 2002)
VW		20	38	1,6 (Cheung et al., 1980)
WL	48	13	26	10 (Martin et al., 2008)
WW		12	14	68 (Lunow et al., 2013)
IY		115	61	6,1 (Sato et al., 2002)
VY	121	62	176	22 (Cheung et al., 1980)
Peptide gesamt	422	452	413	

Analog zu den bereits beschriebenen ACE-Assays mit rIW und cIW wurde auch hier die Hemmung des ACEs aus unterschiedlichen Quellen untersucht (Tabelle 4.3). Bei den beiden löslichen ACE-Quellen war der IC₅₀-Wert vom Peptidmix Molke etwa 5-fach (ACE aus Kaninchenlunge) bzw. 2-2,5-fach niedriger (ACE aus humanem Plasma), im Vergleich zu den IC₅₀-Werten für die Peptidmische Soja und Reis. Mit dem ACE aus humanem Plasma wurden zudem etwa 2,5-7-fach höhere IC₅₀-Werte, verglichen mit dem ACE aus der Kaninchenlunge für die drei Peptidmische bestimmt. Die möglichen Ursachen für die Unterschiede in den absoluten Werten zwischen den beiden löslichen ACE-Systemen wurden bereits am Beispiel von IW diskutiert. Eine Studie aus unserem Institut zeigte ebenfalls Unterschiede im ACE-hemmenden Potential der Dipeptide IW, EW und WL von humanem Plasma ACE, verglichen mit ACE aus der Kaninchenlunge (Khedr et al., 2015). Auch der synthetische ACE-Inhibitor Captopril wies ein geringeres hemmendes Potential am humanen Plasma-ACE verglichen mit dem ACE aus der Kaninchenlunge auf. In der gleichen Studie wurde ebenfalls gezeigt, dass IW aufgrund von Abbau durch Proteasen lediglich eine geringe Stabilität im humanen Plasma aufweist (Khedr et al., 2015). Dennoch

ist der Peptidmix des Molkenproteinhydrolysats (höchster Anteil an IW) derjenige mit dem stärksten ACE-hemmenden Effekt.

Abgesehen davon, dass die verwendeten ACE-Systeme humanem und nicht-humanem Ursprungs waren, ist ein weiterer möglicher Grund für die unterschiedlichen Hemmeffekte generell der Spezies-spezifische Unterschied, welcher sich in den Proteinsequenzen der verwendeten ACEs äußert. Nach der Datenbank *universal protein resource* (UniProt) besitzt das ACE vom Kaninchen (P12822) nur eine 87,6 %ige Übereinstimmung mit der Sequenz der humanen Form (P12821). Obwohl die Unterschiede nicht in den aktiven Zentren vom ACE gefunden wurden, ist es dennoch möglich, dass diese Abweichungen zu einer veränderten Tertiärstruktur führen und somit die Bindung der ACE-hemmenden Peptide beeinflussen kann.

Neben dem löslichen ACE wurde ebenfalls das ACE-hemmende Potential von membrangebundenem ACE am Beispiel von HUVECs und Rattenaorta betrachtet. Auch hier war der Peptidmix Molke wesentlich effektiver verglichen mit den pflanzlichen Peptidmischen (in HUVECs etwa 2-3-mal besser). Interessanterweise wurden im Assay mit den HUVECs mit allen Peptidmischen geringere IC_{50} -Werte im Vergleich zum humanen Plasma-Assay bestimmt. Ein Grund für die unterschiedliche Hemmung könnte die vermutlich unterschiedliche Proteaseaktivität in den beiden Assays sein, welche sich verschieden stark auf die Stabilität der einzelnen Peptide auswirken könnte. Allerdings könnte hier auch, im Gegensatz zur ACE-Hemmung mit nur einem Peptid, eine Kompetition der einzelnen in den Peptidmischen enthaltenen Peptide im Hinblick auf einen protease-bedingten Abbau eine Rolle für die unterschiedliche Hemmung spielen.

Da humane Gefäße für diese Experimente nicht verfügbar waren, wurde als Alternative eines komplexeren Gewebes mit membrangebundener ACE-Aktivität die Rattenaorta als zusätzliches Modellsystem verwendet. Auch hier zeigte der Peptidmix von Molke den besten ACE-hemmenden Effekt verglichen mit den anderen Peptidmischen. Jedoch konnte im Verhältnis zu dem Modell der HUVECs ein geringerer ACE-hemmender Effekt gezeigt werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte der bereits erwähnte Spezies-spezifische Unterschied sein, welcher gemäß der Datenbank UniProt vorliegt. Das ACE der Ratte (P47820) zeigt sogar nur eine 84,2 %ige Übereinstimmung mit dem humanen ACE (Datenbank UniProt). Außerdem könnte auch die gewebsspezifische Aktivität der Peptidasen und Proteasen höher sein und somit die Verfügbarkeit der Dipeptide limitieren.

Bei allen verwendeten Assays zeigte der Peptidmix Molke im Vergleich zu den Peptidmischen Soja und Reis den stärksten ACE-hemmenden Effekt (Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4). Auf Grund der Ergebnisse des ACE-hemmenden Potentials der verschiedenen Peptidmische

scheint das Dipeptid IW hauptverantwortlich für deren ACE-Hemmung zu sein. Dies unterstreicht nochmals die Effektivität von IW. Aus diesem Grund sind die Produktion sowie der Einsatz von IW in funktionellen Lebensmitteln von besonderem Interesse, um die Entstehung von Bluthochdruck zu verzögern oder gar zu verhindern.

Tabelle 4.3: IC₅₀-Werte der Peptidmixe von Molke, Soja und Reis in den verschiedenen ACE-Systemen im Überblick

ACE-Quelle	IC ₅₀ -Werte [mg/l]		
	Molke	Soja	Reis
ACE aus Kaninchenlunge	16,60 ± 2,59	86,63 ± 12,87	78,30 ± 9,95
ACE aus humanem Plasma	112,43 ± 7,33	218,53 ± 30,02	282,04 ± 18,51
ACE aus HUVECs	26,17 ± 3,69	46,31 ± 5,38	76,58 ± 11,13
ACE aus Rattenaorta	75,37 ± 19,91	128,63 ± 32,47	144,77 ± 18,77

Der IC₅₀-Wert ist als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben, n = 3-8

Tabelle 4.4: Signifikanzen der Peptidmixe von Molke, Soja und Reis untereinander in den verschiedenen ACE-Systemen im Überblick

ACE-Quelle	Molke vs. Soja	Molke vs. Reis	Soja vs. Reis
ACE aus Kaninchenlunge	***	***	-
ACE aus humanem Plasma	***	***	**
ACE aus HUVECs	**	***	***
ACE aus Rattenaorta	*	**	-

* P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001

5 Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind nach wie vor die häufigste Todesursache. Vor allem Bluthochdruck ist in diesem Zusammenhang ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von koronaren Herzerkrankungen, Myokardinfarkten, Herzinsuffizienz und Schlaganfall. Zur Behandlung der Hypertonie werden unterschiedliche Pharmaka eingesetzt, hauptsächlich Substanzen, die das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) hemmen. Dazu gehören synthetische Inhibitoren des *angiotensin-converting enzyme* (ACE). Für präventive Zwecke können diese ACE-Inhibitoren auf Grund mehrerer Nebenwirkungen nicht eingesetzt werden. Interessant für eine präventive Anwendung sind natürliche ACE-hemmende Peptide, welche in der Sequenz unterschiedlicher Lebensmittelproteine vorliegen und durch enzymatische Hydrolyse freigesetzt werden. Ein besonders potenter ACE-Hemmer ist das Dipeptid Isoleucin-Tryptophan (IW) und damit ein interessanter Kandidat für den Einsatz in einem funktionellen Lebensmittel. Um dies jedoch realisieren zu können, muss IW in einer ausreichenden Menge produziert werden. Durch die enzymatische Hydrolyse ist dies aktuell nicht möglich, da die Peptidsequenz IW sehr selten in Proteinen vorhanden ist.

Aus diesem Grund war es Ziel der vorliegenden Arbeit eine innovative biotechnologische Methode zu etablieren, um das ACE-hemmende Dipeptid IW in höheren Mengen und vor allem lebensmittelkonform zu produzieren.

Die Produktion des ACE-hemmenden Peptids wurde biotechnologisch mittels rekombinanter DNA-Technologie realisiert. Hierfür wurde eine repetitive IW-Sequenz entworfen (264 bp), welche für ein 10 kDa großes Protein codierte. Dieses IW-Konstrukt enthielt in der Sequenz 16-mal IW. Mit Hilfe von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde ein 52 kDa großes Fusionsprotein überexprimiert. Als Fusionstag diente das *Maltose Binding Protein* (MBP). Dieses rekombinante Fusionsprotein (MBP-IW) lag nach einer Kombination von zwei verschiedenen chromatographischen Verfahren gereinigt vor. Mit dieser Methode war es möglich, 0,52 mg lösliches MBP-IW pro 1 g *E. coli* Feuchtmasse zu produzieren.

MBP-IW wurde enzymatisch mit dem Enzym α -Chymotrypsin hydrolisiert und das Dipeptid IW anschließend chromatographisch isoliert. Nach der Hydrolyse und Isolation lag die Ausbeute des rekombinant produzierten IW (rIW) mit einer Reinheit von $\geq 96\%$ bei 14 μg . Somit konnten 28 % des möglichen Anteils an rIW vom sauberen MBP-IW gewonnen werden.

Die Identifikation von IW erfolgte mit drei unterschiedlichen Methoden, der *reversed phase-high performance liquid chromatography*-UV-Detektion, der *liquid chromatography-*

electrospray ionisation-tandem mass spectrometry und durch eine N-terminale Derivatisierung des Peptids. Mit diesen Methoden wurde bestätigt, dass es sich bei dem produzierten Peptid um IW handelte.

Das rIW wurde im Vergleich zum chemisch produzierten kommerziell erwerblichen L-IW (cIW) und chemisch produzierten kommerziell erwerblichen D-IW (cDIW) auf sein ACE-hemmendes Potential getestet. Um der komplexen und heterogenen Verteilung der ACE-Aktivität im menschlichen Organismus gerecht zu werden, wurde das ACE-hemmende Potential der Dipeptide an verschiedenen ACE-Quellen untersucht. Neben dem nicht-humanen ACE-System (ACE aus der Kaninchenlunge) wurde auch humanes lösliches ACE (aus humanem Plasma) sowie humanes membrangebundenes ACE (aus *Human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) verwendet. Bei allen getesteten ACE-Systemen zeigte sich kein ACE-hemmendes Potential durch cDIW. Beim Vergleich von rIW mit cIW in Bezug auf deren ACE-hemmendes Potential wurden IC_{50} -Werte von $1,72 \pm 0,12$ bis $23,30 \pm 3,68 \mu M$, abhängig vom getesteten ACE-System, bestimmt. Für alle verwendeten ACE-Quellen konnte gezeigt werden, dass beide unterschiedlich produzierten Dipeptide gleich effektiv waren.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin neben einem Peptidmix aus Molkenprotein mit hohem Anteil an IW, noch zwei weitere Peptidmixe pflanzlichen Proteinursprungs hinsichtlich des ACE-hemmenden Potentials zu untersuchen.

Auf Grundlage der identifizierten tryptophan- und tyrosinhaltigen Dipeptide in den Hydrolysaten des Molken-, Soja- und Reisproteins wurden drei Peptidmixe hergestellt. Auch hier wurde wieder die Wirkung auf mehrere ACE-Quellen ermittelt. Neben den oben genannten, wurde hier zusätzlich der Einfluss auf membrangebundenes ACE der Rattenaorta untersucht. In allen getesteten ACE-Systemen zeigte der Peptidmix Molke ein signifikant höheres ACE-hemmendes Potential als die Peptidmixe von Soja und Reis. Der Peptidmix Soja war von den getesteten hydrolysierten Pflanzenproteinen der potenteste ACE-Inhibitor. Die IC_{50} -Werte der Peptidmixe lagen, je nach getestetem ACE-System, zwischen $16,60 \pm 2,59$ und $282,04 \pm 18,51 \text{ mg/l}$. Der starke ACE-hemmende Effekt vom Peptidmix Molke wurde mit der hohen Konzentration an IW assoziiert (bis zu 10-fach höher verglichen mit den anderen beiden Peptidmixen). Dies legt nahe, dass das Dipeptid IW hauptverantwortlich für das ACE-hemmende Potential in den getesteten Peptidmixen ist, was nochmals das große Potential des Dipeptids verdeutlicht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IW aus Molkenprotein im Vergleich mit den bioaktiven Peptidquellen der Proteine aus Soja und Reis, die stärkste ACE-

Hemmung aufweist. Des Weiteren ist es erstmals gelungen, das ACE-hemmende Dipeptid IW in hoher Reinheit biotechnologisch mit Hilfe von rekombinanten Proteinen herzustellen.

Um den Einsatz als funktionelles Lebensmittel realisieren zu können, müsste im Weiteren die biotechnologische Herstellung von IW optimiert werden, um eine höhere Ausbeute zu generieren. Nach dieser Optimierung könnte in einem Scale-up Verfahren so viel an IW gewonnen werden, dass es industriell einsetzbar wäre. Die ACE-hemmende Wirkung des biotechnologisch hergestellten IWs wurde in dieser Arbeit bestätigt, sodass es in einem innovativen funktionellen Lebensmittel für die tägliche Ernährung eingesetzt werden könnte. Perspektivisch eröffnet sich damit die Möglichkeit IW präventiv zu nutzen, um die Entwicklung von Bluthochdruck und deren Folgeschädigungen zu verzögern oder zu minimieren.

6 Summary

Cardiovascular diseases are still the leading cause of death. Especially hypertension is an important risk factor for the development of coronary heart disease, myocardial infarction, heart failure and stroke. To treat hypertension different drugs are clinically used. These are mainly substances, which inhibit the renin-angiotensin-aldosterone-system (RAAS), such as synthetic inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE). However these ACE-inhibitors cannot be used for preventive purposes because of several side effects. Therefore natural ACE-inhibitory peptides, which are mostly encrypted in food proteins and released by enzymatic hydrolysis, are of main interest for preventive applications. The dipeptide isoleucine-tryptophan (IW) is a potent ACE-inhibitor and thus an interesting ingredient in functional foods. However, to realize this, IW must be produced in sufficient amounts. This is not possible with the current enzymatic hydrolysis, because the peptide sequence of IW is very rarely present in proteins.

For that reason, the aim of the present thesis was to establish an innovative biotechnological method to produce the ACE-inhibitory dipeptide IW in an enlarged amount and especially considering the food-safety.

The production of the ACE-inhibitory peptide was realized biotechnologically via recombinant DNA technology. For this, a repetitive IW-sequence (264 bp) was designed, which encoded a 10 kDa protein. In this IW-construct IW was sequenced 16 times. Using *Escherichia coli* (*E. coli*) a fusion protein with a size of 52 kDa was overexpressed. The maltose binding protein (MBP) served as fusion tag. This recombinant fusion protein (MBP-IW) was purified by a combination of two different chromatographic methods. It has become possible to produce 0.52 mg of soluble MBP-IW per 1 g wet weight of *E. coli*.

MBP-IW was enzymatically hydrolysed with the enzyme α -chymotrypsin and the dipeptide IW was subsequently isolated by chromatography. After hydrolysis and isolation, the yield of the recombinant produced IW (rIW) with a purity of $\geq 96\%$ was 14 μg . Thus, 28 % from the possible content of rIW was obtained from the clean MBP-IW.

IW was identified by three different methods: reversed phase-high performance liquid chromatography with UV-detection, liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry and N-terminal derivatization of the peptide. These methods confirmed the produced peptide as IW.

The ACE-inhibitory potential of rIW was analysed and compared to that of the chemically produced commercially available L-IW (cIW) and of the chemically produced commercially

available D-IW (cDIW). To address the complex and heterogeneous distribution of ACE-activity in the human organism, the ACE-inhibitory potential of the dipeptides was investigated in different ACE-sources. Additionally to non-human ACE (from rabbit lung) also human soluble ACE (from human plasma) and human membrane-bound ACE (from human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) were used. In all tested ACE-systems cDIW did not show any ACE-inhibitory effect. IC₅₀ values of rIW and cIW ranged from 1.72 ± 0.12 to $23.30 \pm 3.68 \mu\text{M}$, depending on the investigated ACE-system. In all sources of ACE an equal inhibitory potency of both differently produced dipeptides were determined.

The second aim of the thesis was to investigate the ACE-inhibitory effect of two peptide mixes of plant proteins beside the peptide mix of whey protein, containing a high concentration of IW.

Based on the identified tryptophan- and tyrosine-containing dipeptides in the hydrolysates of the whey-, soy- and rice-protein, three peptide mixes were prepared. Also here the effect on different ACE-sources was determined. Additionally to the named above, membrane-bound ACE from rat aorta was investigated. In all analysed ACE-systems, the peptide mix of whey showed a significantly higher ACE-inhibitory potential than the peptide mixes of soy and rice. The peptide mix soy was the most potent ACE-inhibitor tested among the hydrolysed plant proteins. The IC₅₀-values of the peptide mixes were between 16.60 ± 2.59 and $282.04 \pm 18.51 \text{ mg/l}$, depending on the used ACE-system. The strong ACE-inhibitory effect of the whey peptide mix was associated with the high concentration of IW (10 times higher compared to the other peptide mixes). This indicates that the dipeptide IW is mainly responsible for the ACE-inhibitory potential in the investigated peptide mixes, which demonstrate again the great potential of this dipeptide.

It was shown in the present study that IW from whey protein had the strongest ACE-inhibition compared to the bioactive peptides of proteins from soy and rice. Furthermore, for the first time it was possible to produce the ACE-inhibitory dipeptide IW in high purity biotechnologically using recombinant proteins.

To use IW as an ingredient in functional foods, the biotechnological production of IW needs to be optimized to receive higher yields. After this optimization, it would be conceivable to increase the production of IW in a scale-up process for industrial application. The ACE-inhibitory effect of the biotechnologically produced IW was confirmed in the present study, thus it could be used in an innovative functional food for daily nutrition. Prospectively, this increases the possibility of using IW preventively in order to delay or minimize the development of hypertension and the consequentially diseases.

7 Literaturverzeichnis

- Abelous JE, Bardier E. 1909. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *CR Soc Biol* 66:511–520.
- Ahmad I, Yanuar A, Mulia K, Mun'im A. 2017. Review of angiotensin-converting enzyme inhibitory assay: Rapid method in drug discovery of herbal plants. *Pharmacogn Rev* 11:1–7.
- Al-Gburi S, Deussen AJ, Galli R, Muders MH, Zatschler B, Neisser A, Müller B, Kopaliani I. 2017. Sex-specific differences in age-dependent progression of aortic dysfunction and related cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 312:R835–R849.
- Bader M. 2010. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:439–465.
- Bader M, Ganten D. 2008. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med* 86:615–621.
- Balti R, Bougatef A, Sila A, Guillochon D, Dhulster P, Nedjar-Arroume N. 2015. Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem* 170:519–525.
- Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 10:411–21.
- Battison AL, Summerfield R, Patrzykat A. 2008. Isolation and characterisation of two antimicrobial peptides from haemocytes of the American lobster *Homarus americanus*. *Fish Shellfish Immunol* 25:181–187.
- Baudin B. 2002. New Aspects on Angiotensin-Converting Enzyme: from Gene to Disease. *Clin Chem Lab Med* 40:256–265.
- Boelsma E, Klok J. 2010. IPP-rich milk protein hydrolysate lowers blood pressure in subjects with stage 1 hypertension, a randomized controlled trial. *Nutr J* 9:52.
- Borghi C, Rossi F. 2015. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Its Pharmacological Inhibitors in Cardiovascular Diseases: Complex and Critical Issues. *High Blood Press {&} Cardiovasc Prev* 22:429–444.

- Bryant JW, Shariat-Madar Z. 2009. Human Plasma Kallikrein-Kinin System: Physiological and Biochemical Parameters. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 7:234–250.
- Busse R. 2007. Synopsis der lokalen und systemischen Durchblutungsregulation, Langfristige Regulationsmechanismen. In: Schmidt RF, Lang F (Hrsg). *Physiologie Des Menschen mit Pathophysiologie*. 30. Aufl. Springer, Berlin, S. 661-668.
- Buttar HS. 1997. An overview of the influence of ACE inhibitors on fetal-placental circulation and perinatal development. *Mol Cell Biochem* 176:61–71.
- Bzymek M, Lovett ST. 2001. Instability of repetitive DNA sequences: The role of replication in multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci* 98:8319–8325.
- Carpino LA, Han GY. 1970. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, a New Base-Sensitive Amino-Protecting Group. *J Am Chem Soc* 92:5748–5749.
- Carrio MM, Villaverde A. 2005. Localization of Chaperones DnaK and GroEL in Bacterial Inclusion Bodies. *J Bacteriol* 187:3599–3601.
- Chandrudu S, Simerska P, Toth I. 2013. Chemical Methods for Peptide and Protein Production. *Molecules* 18:4373–4388.
- Cheung H-S, Wang F-L, Ondetti MA, Sabo EF, Cushman DW. 1980. Binding of Peptide Substrates and Inhibitors of Angiotensin-converting Enzyme. *J Biol Chem* 255:401–407.
- Chobanian A V., Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Roccella EJ. 2003. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42:1206–1252.
- Cicero AFG, Aubin F, Azais-Braesco V, Borghi C. 2013. Do the Lactotripeptides Isoleucine-Proline-Proline and Valine-Proline-Proline Reduce Systolic Blood Pressure in European Subjects? A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Am J Hypertens* 26:442–449.
- Collier SR, Landram MJ. 2012. Treatment of prehypertension: lifestyle and/or medication. *Vasc Health Risk Manag* 8:613–619.
- Cooper WO, Hernandez-Diaz S, Arbogast PG, Dudley JA, Dyer S, Gideon PS, Hall K, Ray WA. 2006. Major Congenital Malformations after First-Trimester Exposure to ACE Inhibitors. *N Engl J Med* 354:2443–2451.

- Costerousse O, Danilov S, Alhenc-Gelas F. 1997. Genetics of Angiotensin I-Converting Enzyme. Clin Exp Hypertens 19:659–669.
- Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin- converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharmacol 20:1637–1648.
- Darewicz M, Borawska J, Vegarud GE, Minkiewicz P, Iwaniak A. 2014. Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity and ACE Inhibitory Peptides of Salmon (Salmo salar) Protein Hydrolysates Obtained by Human and Porcine Gastrointestinal Enzymes. Int J Mol Sci 15:14077–14101.
- Dawson PE, Muir TW, Clark-Lewis I, Kent SBH. 1994. Synthesis of proteins by native chemical ligation. Science (80-) 266:776–779.
- De Mello WC, Frohlich ED. 2014. Clinical perspectives and fundamental aspects of local cardiovascular and renal renin-angiotensin systems. Front Endocrinol (Lausanne) 5:1–9.
- Doggrell SA, Wanstall JC. 2004. Vascular chymase: pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition. Cardiovasc Res 61:653–662.
- Dołowy M, Pyka A. 2014. Application of TLC, HPLC and GC methods to the study of amino acid and peptide enantiomers : a review. Biomed Chromatogr 28:84–101.
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. 2000. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. Circ Res 87:e1–e9.
- Doumas M, Tsioufis C, Faselis C, Lazaridis A, Grassos H, Papademetriou V. 2014. Non-interventional management of resistant hypertension. World J Cardiol 6:1080–1090.
- Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlöf B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, Gilst W Van, Hansson L, Hornig B, et al. 2002. Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report. Cardiovasc Drugs Ther 16:149–160.
- Eyries M, Michaud A, Deinum J, Agrapart M, Chomilier J, Kramers C, Soubrier F. 2001. Increased Shedding of Angiotensin-converting Enzyme by a Mutation Identified in the Stalk Region. J Biol Chem 276:5525–5532.

- Fernandez LA, de Lorenzo V. 2001. Formation of disulphide bonds during secretion of proteins through the periplasmic-independent type I pathway. *Mol Microbiol* 40:332–346.
- Feroz F, Hobson MP. 2008. Multimodal nested sampling: an efficient and robust alternative to Markov Chain Monte Carlo methods for astronomical data analyses. *Mon Not R Astron Soc* 384:449–463.
- Ferreira SH. 1965. A BRADYKININ-POTENTIATING FACTOR (BPF) PRESENT IN THE VENOM OF BOTHROPS JARARACA. *Br J Pharmacol Chemother* 24:163–169.
- FitzGerald RJ, Meisel H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Br J Nutr* 84:33–37.
- Flamm EL. 1991. How FDA Approved Chymosin: A Case History. *Nat Biotechnol* 9:349–351.
- Flores-Munoz M, Work LM, Douglas K, Denby L, Dominiczak AF, Graham D, Nicklin SA. 2012. Angiotensin-(1-9) Attenuates Cardiac Fibrosis in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat via the Angiotensin Type 2 Receptor. *Hypertension* 59:300–307.
- Froogh G, Pinto JT, Le Y, Kandhi S, Alelignie Y, Huang A, Sun D. 2017. Chymase-dependent production of angiotensin II: an old enzyme in old hearts. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 312:H223–H231.
- Fuchs FD. 2010. Prehypertension: The rationale for early drug therapy. *Cardiovasc Ther* 28:339–343.
- Gabb GM, Ryan P, Wing LMH, Hutchinson KA. 1996. Epidemiological study of angioedema and ACE inhibitors. *Aust N Z J Med* 26:777–782.
- Gustafsson C, Govindarajan S, Minshall J. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* 22:346–353.
- Guyton AC, Coleman TG, Cowley AW, Scheel KW, Manning RD, Norman RA. 1972. Arterial pressure regulation. *Am J Med* 52:584–594.
- Hagaman JR, Moyer JS, Bachman ES, Sibony M, Magyar PL, Welch JEE, Smithies O, Kregge JH, O'Brien DA. 1998. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2552–2557.

- Hammarström M, Hellgren N, Berg S van den, Berglund H, Hård T. 2002. Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Sci* 11:313–321.
- Hernández-Ledesma B, Amigo L, Recio I, Bartolomé B. 2007. ACE-Inhibitory and Radical-Scavenging Activity of Peptides Derived from β -Lactoglobulin f(19–25). Interactions with Ascorbic Acid. *J Agric Food Chem* 55:3392–3397.
- Hernández-Ledesma B, Mar Contreras M del, Recio I. 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv Colloid Interface Sci* 165:23–35.
- Idiris A, Tohda H, Kumagai H, Takegawa K. 2010. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:403–417.
- Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. 1993. Differences in the Properties and Enzymatic Specificities of the Two Active Sites of Angiotensin I-converting Enzyme (Kininase II) Studies with Bradykinin and other natural Peptides. *J Biol Chem* 268:9496–9503.
- Jauhiainen T, Collin M, Narva M, Cheng ZJ, Poussa T, Vapaatalo H, Korpela R. 2005. Effect of long-term intake of milk peptides and minerals on blood pressure and arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Milchwissenschaft* 60:358–363.
- Jeong DW, Shin DS, Ahn CW, Song IS, Lee HJ. 2007. Expression of antihypertensive peptide, His-His-Leu, as tandem repeats in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol* 17:952–959.
- Juillard V, Guillot A, Bars D Le, Gripon J-C. 1998. Specificity of milk peptide utilization by *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 64:1230–1236.
- Kaiser S, Martin M, Lunow D, Rudolph S, Mertten S, Möckel U, Deußen A, Henle T. 2016. Tryptophan-containing dipeptides are bioavailable and inhibit plasma human angiotensin-converting enzyme in vivo. *Int Dairy J* 52:107–114.
- Kapust RB, Waugh DS. 1999. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* 8:1668–1674.
- Khedr S, Deussen A, Kopalani I, Zatschler B, Martin M. 2017. Effects of tryptophan-containing peptides on angiotensin-converting enzyme activity and vessel tone ex vivo and in vivo. *Eur J Nutr* 0:0.

- Khedr S, Martin M, Deussen A. 2015. Inhibitory Efficacy and Biological Variability of Tryptophan Containing Dipeptides on Human Plasma Angiotensin Converting Enzyme Activity. *J Hypertens Open Access* 4:2–6.
- Khiari Z, Rico D, Martin-Diana AB, Barry-Ryan C. 2014. Structure elucidation of ACE-inhibitory and antithrombotic peptides isolated from mackerel skin gelatine hydrolysates. *J Sci Food Agric* 94:1663–1671.
- Kilian I, Kothe HW, Zitzmann N (Hrsg). 2012. *Großes Buch der Biologie*. Compact Verlag, München, S.113.
- Kobayashi Y, Yamauchi T, Katsuda T, Yamaji H, Katoh S. 2008. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory mechanism of tripeptides containing aromatic residues. *J Biosci Bioeng* 106:310–312.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Landry TD, Chew L, Davis JW, Frawley N, Foley HH, Stelman SJ, Thomas J, Wolt J, Hanselman DS. 2003. Safety evaluation of an α -amylase enzyme preparation derived from the archaeal order Thermococcales as expressed in *Pseudomonas fluorescens* biovar I. *Regul Toxicol Pharmacol* 37:149–168.
- Leitzmann C. 2014. Vegetarian nutrition: past, present, future. *Am J Clin Nutr* 100:496S–502S.
- Li G-H, Qu M-R, Wan J-Z, You J-M. 2007. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 16:275–280.
- Liu D, Sun H, Zhang L, Li S, Qin Z. 2007. High-Level Expression of Milk-Derived Antihypertensive Peptide in *Escherichia coli* and Its Bioactivity. *J Agric Food Chem* 55:5109–5112.
- Losacco M, Gallerani R, Gobetti M, Minervini F, Leo F De. 2007. Production of active angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine β -casein by recombinant DNA technologies. *Biotechnol J* 2:1425–1434.
- Lunow D, Kaiser S, Brückner S, Gotsch A, Henle T. 2013. Selective release of ACE-inhibiting tryptophan-containing dipeptides from food proteins by enzymatic hydrolysis. *Eur Food Res Technol* 237:27–37.

- Majumder K, Chakrabarti S, Morton JS, Panahi S, Kaufman S, Davidge ST, Wu J. 2013. Egg-Derived Tri-Peptide IRW Exerts Antihypertensive Effects in Spontaneously Hypertensive Rats. *PLoS One* 8:e82829.
- Majumder K, Wu J. 2015. Molecular Targets of Antihypertensive Peptides: Understanding the Mechanisms of Action Based on the Pathophysiology of Hypertension. *Int J Mol Sci* 16:256–283.
- Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, Backer G De, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, et al. 2013. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J* 34:2159–2219.
- Martin M, Kopaliani I, Jannasch A, Mund C, Todorov V, Henle T, Deussen A. 2015. Antihypertensive and cardioprotective effects of the dipeptide isoleucine-tryptophan and whey protein hydrolysate. *Acta Physiol* 215:167–176.
- Martin M, Wellner A, Ossowski I, Henle T. 2008. Identification and Quantification of Inhibitors for Angiotensin-Converting Enzyme in Hypoallergenic Infant Milk Formulas. *J Agric Food Chem* 56:6333–6338.
- Mendoza-Torres E, Oyarzún A, Mondaca-Ruff D, Azocar A, Castro PF, Jalil JE, Chiong M, Lavandero S, Ocaranza MP. 2015. ACE2 and vasoactive peptides: novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 9:217–237.
- Merrifield RB. 1963. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 85:2149–2154.
- Michaud A, Acharya KR, Masuyer G, Quenech' du N, Gribouval O, Morinière V, Gubler M-C, Corvol P. 2014. Absence of cell surface expression of human ACE leads to perinatal death. *Hum Mol Genet* 23:1479–1491.
- Michelke L, Deussen A, Dieterich P, Martin M. 2017. Effects of bioactive peptides encrypted in whey-, soy- and rice protein on local and systemic angiotensin-converting enzyme activity. *J Funct Foods* 28:299–305.
- Miguel M, López-Fandiño R, Ramos M, Aleixandre A. 2005. Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *Br J Nutr* 94:731.

- Missiakas D, Raina S. 1997. MINIREVIEW Protein Folding in the Bacterial Periplasm. *J Bacteriol* 179:2465–2471.
- Miyazaki H, Ohnishi J, Shibata T. 1996. Angiotensin II Receptor Subtypes: Their Distribution Signaling Pathways, and Physiological Functions. *Zoolog Sci* 13:641–646.
- Miyazaki M, Takai S. 2001. Local Angiotensin II-Generating System in Vascular Tissues: the Roles of Chymase. *Hypertens Res* 24:189–193.
- Moinuddin A, Gupta R, Saxena Y. 2016. Assessment of anthropometric indices, salt intake and physical activity in the aetiology of prehypertension. *J Clin Diagnostic Res* 10:CC11-CC14.
- Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S, Takano T. 1995. Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk. *J Dairy Sci* 78:777–783.
- Neal B, MacMahon S, Chapman N. 2000. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood pressure lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. *Lancet* 356:1955–1964.
- New England Biolabs. 2011. K. lactis Protein Expression Kit - Instruction Manual E1000S. Version 1.1.
- New England Biolabs. 2015. pMAL™ Protein Fusion & Purification System - Instruction Manual E8200. Version 3.0.
- Nongoniema AB, FitzGerald RJ. 2015. Milk proteins as a source of tryptophan-containing bioactive peptides. *Food Funct* 6:2115–2127.
- Olempska-Beer ZS, Merker RI, Ditto MD, DiNovi MJ. 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Regul Toxicol Pharmacol* 45:144–158.
- Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. 1977. Design of Specific Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme: New Class of Orally Active Antihypertensive Agents. *Science* (80-) 196:441–444.
- Paul M, Mehr AP, Kreutz R. 2006. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol Rev* 86:747–803.
- Piepho RW. 2000. Overview of the angiotensin-converting-enzyme inhibitors. *Am J Heal Pharm* 57:S3–7.

- Quan A. 2006. Fetopathy associated with exposure to angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor antagonists. *Early Hum Dev* 82:23–28.
- Rhaleb N-E, Yang X-P, Carretero OA. 2011. The Kallikrein-Kinin System as a Regulator of Cardiovascular and Renal Function. *Compr Physiol* 1:971–993.
- Riordan JF. 2003. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol* 4:225–229.
- Roth R, Zyl P van, Tsekoa T, Stoychev S, Mamputha S, Buthelezi S, Crampton M. 2017. Co-expression of sulphhydryl oxidase and protein disulphide isomerase in *Escherichia coli* allows for production of soluble CRM 197. *J Appl Microbiol* 122:1402–1411.
- Saito T, Nakamura T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. 2000. Isolation and Structural Analysis of Antihypertensive Peptides That Exist Naturally in Gouda Cheese. *J Dairy Sci* 83:1434–1440.
- Santos CF, Akashi AE, Dionísio TJ, Sipert CR, Didier DN, Greene AS, Oliveira SHP, Pereira HJV, Becari C, Oliveira EB, Salgado MCO. 2009. Characterization of a Local Renin-Angiotensin System in Rat Gingival Tissue. *J Periodontol* 80:130–139.
- Santos RAS, Simoes AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, Buhr I De, Heringer-walther S, Pinheiro SVB, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, et al. 2003. G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:34–49.
- Santos RAS, Ferreira AJ. 2007. Angiotensin-(1–7) and the renin–angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16:122–128.
- Sato M, Hosokawa T, Yamaguchi T, Nakano T, Muramoto K, Kahara T, Funayama K, Kobayashi A, Nakano T. 2002. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Wakame (*Undaria pinnatifida*) and Their Antihypertensive Effect in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Agric Food Chem* 50:6245–6252.
- Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T, Korpela R. 2003. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr* 77:326–330.
- Shin Z-I k, Yu R, Park S-A, Chung DK, Ahn C-W, Nam H-S, Kim K-S, Lee HJ. 2001. His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity in vivo. *J Agric Food Chem* 49:3004–9.

- Sienkiewicz T. 1981. Nomenklatur und einige Eigenschaften der Molkenproteine. 2. Mitt. a-Lactalbumin, Immunoglobuline, Proteose-Peptide, Minorproteine und Enzyme. *Nahrung* 25:335–343.
- Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK. 2015. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact* 14:41.
- Sipola M, Finckenberg P, Korpela R, Vapaatalo H, Nurminen M. 2002. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J Dairy Res* 69:103–11.
- Skilling J. 2006. Nested sampling for general Bayesian computation. *Bayesian Anal* 1:833–859.
- Song J, Chen W, Lu Z, Hu X, Ding Y. 2011. Soluble expression, purification, and characterization of recombinant human flotillin-2 (reggie-1) in *Escherichia coli*. *Mol Biol Rep* 38:2091–2098.
- Spohner SC, Schaum V, Quitmann H, Czermak P. 2016. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. *J Biotechnol* 222:104–116.
- Stabouli S, Kotsis V, Rizos Z, Toumanidis S, Karagianni C, Constantopoulos A, Zakopoulos N. 2009. Left ventricular mass in normotensive, prehypertensive and hypertensive children and adolescents. *Pediatr Nephrol* 24:1545–1551.
- Su JB. 2014. Different cross-talk sites between the renin–angiotensin and the kallikrein–kinin systems. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 15:319–328.
- Thom VT, Wendel M, Deussen A. 2013. Regulation of Ecto-5'-Nucleotidase by Docosahexaenoic Acid in Human Endothelial Cells. *Cell Physiol Biochem* 32:355–366.
- Tsume Y, Incecayir T, Song X, Hilfinger JM, Amidon GL. 2014. The development of orally administrable gemcitabine prodrugs with d-enantiomer amino acids: Enhanced membrane permeability and enzymatic stability. *Eur J Pharm Biopharm* 86:514–523.
- Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. 1990. Identification of a Highly Specific Chymase Enzyme in the Human Heart * as the Major Angiotensin cardiac. *J Biol Chem* 265:22348–22357.

- van Ooyen AJJ, Dekker P, Huang M, Olsthoorn MMA, Jacobs DI, Colussi PA, Taron CH. 2006. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* 6:381–392.
- van Regenmortel MH, Muller S. 1998. D-peptides as immunogens and diagnostic reagents. *Curr Opin Biotechnol* 9:377–382.
- Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatsky M. 2010. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today* 15:40–56.
- von der Linden W, Dose V, Toussaint U von. 2014. *BAYESIAN PROBABILITY THEORY Applications in the Physical Sciences*. Cambridge University Press.
- Walper SA, Battle SR, Brozozog Lee AP, Zabetakis D, Turner KB, Buckley PE, Calm AM, Welsh HS, Warner CR, Zacharko MA, Goldman ER, Anderson GP. 2014. Thermostable single domain antibody–maltose binding protein fusion for *Bacillus anthracis* spore protein BclA detection. *Anal Biochem* 447:64–73.
- Waugh DS. 2016. The remarkable solubility-enhancing power of *Wscherichia coli* maltose-binding protein. *Postepy Biochem* 62:377–382.
- Wei L, Alhenc-Gelas F, Corvol P, Clauser E. 1991a. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J Biol Chem* 266:9002–9008.
- Wei L, Alhenc-Gelas F, Soubrier F, Michaud A, Corvol P, Clauser E. 1991b. Expression and Characterization of Recombinant Human Angiotensin I-converting Enzyme EVIDENCE FOR A C-TERMINAL TRANSMEMBRANE ANCHOR AND FOR A PROTEOLYTIC PROCESSING OF THE SECRETED RECOMBINANT AND PLSAMA ENZYMES*. *J Biol Chem* 266:5540–5546.
- Welch WJ. 2008. Angiotensin II-Dependent Superoxide: Effects on Hypertension and Vascular Dysfunction. *Hypertension* 52:51–56.
- Wessel D, Flügge UI. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138:141–3.
- Wexler R, Aurkerman G. 2006. Nonpharmacologic Strategies for Managing Hypertension. *Am Fam Physician* 73:1953–1958.
- White CM. 1998. Pharmacologic, pharmacokinetic, and therapeutic differences among ACE inhibitors. *Pharmacotherapy* 18:588–599.

- Wijesekara I, Kim SK. 2010. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: Prospects in the pharmaceutical industry. *Mar Drugs* 8:1080–1093.
- Wu S-J, Soulez M, Yang Y-H, Chu C-S, Shih S-C, Hébert M-J, Kuo M-C, Hsieh Y-J. 2015. Local augmented angiotensinogen secreted from apoptotic vascular endothelial cells is a vital mediator of vascular remodelling. *PLoS One* 10:1–15.
- Yamane H, Asechi M, Tsuneyoshi Y, Denbow DM, Furuse M. 2009. Central L-cysteine induces sleep, and D-cysteine induces sleep and abnormal behavior during acute stress in neonatal chicks. *Anim Sci J* 80:428–432.
- Yusuf S, Sleight P, Dagenais G, Montague T, Bosch J, Pogue J, Taylor W, Sardo L. 2000. Effects of an Angiotensin-Converting–Enzyme Inhibitor, Ramipril, on Cardiovascular Events in High-Risk Patients. *N Engl J Med* 342:145–153.
- Zaman MA, Oparil S, Calhoun DA. 2002. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov* 1:621–36.

8 Anhang

8.1 Material und Methoden

8.1.1 Vektorkarten

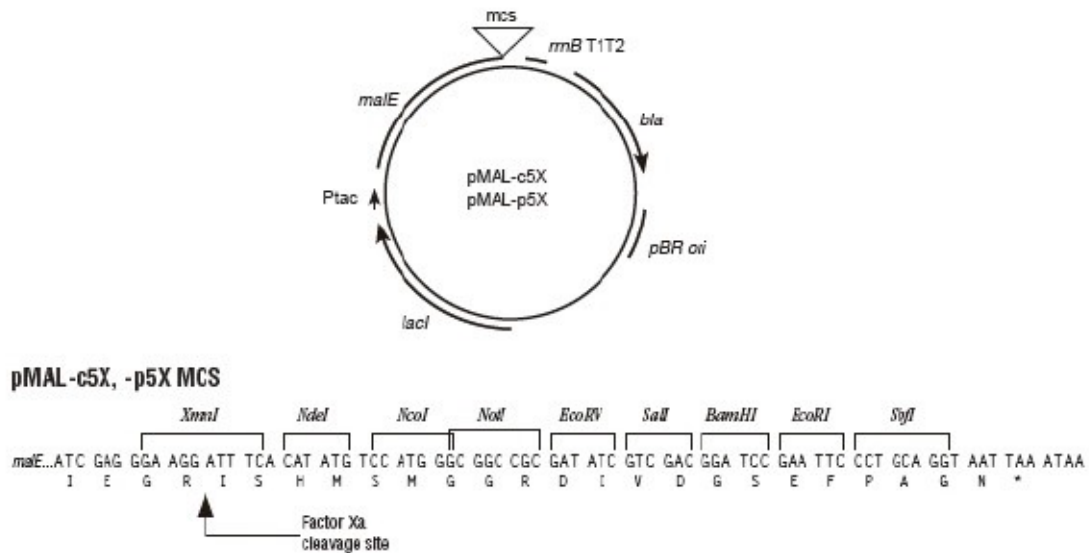


Abbildung 8.1: Expressionsvektor pMAL-c5X mit dem induzierbaren Promotor Ptac, dem Gen *malE*, welches für das Protein MBP codiert, und dem Gen *bla* für eine Amp-Resistenz; Detaillierte Darstellung der MCS des Vektors mit den verschiedenen Restriktionsschnittstellen und der Schnittstelle für Faktor Xa (New England Biolabs, 2015)

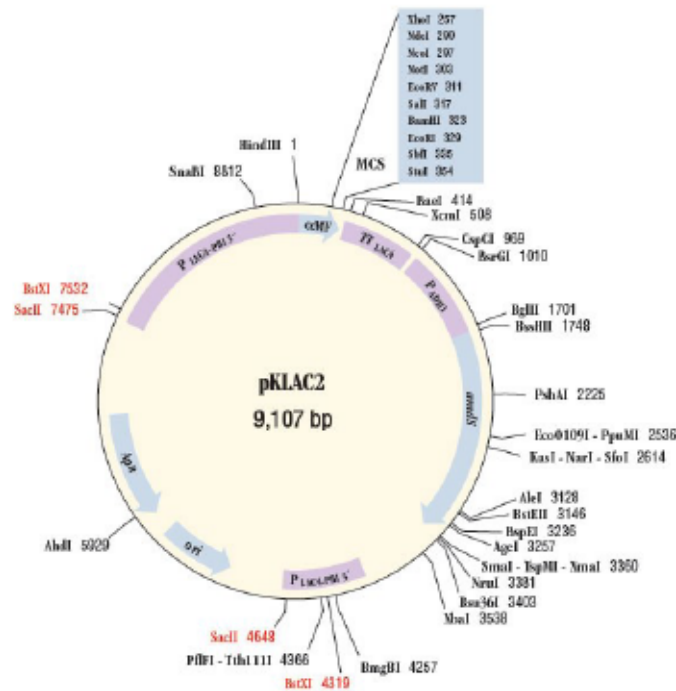


Abbildung 8.2: Expressionsvektor pKLAC2 mit den Promotor-Abschnitten $P_{LAC4-PBI}$ 3' und $P_{LAC4-PBI}$ 5', der α -mating factor domain für eine sekretorische Proteinexpression sowie den Selektionsmarkern *amdS* und Ap^R (New England Biolabs, 2011)

8.1.2 Isolierung des IW-Konstrukts von MBP durch Faktor Xa

Im letzten Schritt sollte laut pMAL Protein Fusion&Purification System das gereinigte Protein (MBP-IW) mit der Protease Faktor Xa an der spezifischen Schnittstelle voneinander getrennt werden (IW-Konstrukt einzeln ohne Bindung an MBP). Die Fraktionen mit der größten Menge des Proteins MBP-IW nach der Reinigung wurden vereint und eine Proteinbestimmung durchgeführt (2.3.1). Vom Protein MBP-IW wurden je Ansatz 20 μ g eingesetzt und entweder mit 0,2 μ g (1 %) oder 1 μ g (5 %) des Enzyms Faktor Xa inkubiert. Zusätzlich sollte noch getestet werden, ob SDS (0,05 %) förderlich für eine Trennung von MBP und dem IW-Konstrukt ist. Weiterhin wurde ein Leerwert mitgeführt. Die verschiedenen Ansätze sind der Tabelle 8.1 zu entnehmen. Nach 16 h, 24 h, 48 h und 72 h bei 4 °C wurden jeweils 5 μ l der Probe entnommen mit 2 x SDS-Ladepuffer und 20 mM DTT versetzt, 10 min bei 95 °C erhitzt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Tabelle 8.1: Reaktionsansätze zur Isolierung des IW-Konstrukts von MBP mittels Faktor Xa

Komponenten	Leerwert	1 % Xa	1 % Xa + 0,05 % SDS	5 % Xa	5 % Xa + 0,05 % SDS
Protein (1000 µg/ml)	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Faktor Xa (200 µg/ml)	-	1 µl	1 µl	-	-
Faktor Xa (1000 µg/ml)	-	-	-	1 µl	1 µl
SDS (1 %)	-	-	1,1 µl	-	1,1 µl

8.1.3 Pufferzusammensetzung der SDS-Gele für die SDS-PAGE

Tabelle 8.2: Zusammensetzung der SDS-Gele für die SDS-PAGE nach Laemmli

Komponenten für SDS-Gele	Menge für 2 SDS-Gele		
	10 %	12 %	15 %
Trenngel			
ddH ₂ O	7,9 ml	6,6 ml	4,6 ml
30 % Acrylamid	6,7 ml	8,0 ml	10,0 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml
10 % SDS	200 µl	200 µl	200 µl
10 % APS	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl
Sammelgel	Das Sammelgel ist für alle Konzentrationen gleich		
ddH ₂ O		5,5 ml	
30 % Acrylamid		1,3 ml	
1,0 M Tris, pH 6,8		1,0 ml	
10 % SDS		80 µl	
10 % APS		80 µl	
TEMED		8 µl	

8.2 Ergebnisse

8.2.1 *Isolierung des IW-Konstrukts von MBP durch Faktor Xa*

Zur Isolierung des IW-Konstrukts vom Affinitätstag MBP wurde ein Verdau mit dem Enzym Faktor Xa durchgeführt. Dieses Enzym ist in der Lage, spezifisch nach der für MBP codierenden Sequenz zu schneiden. Als Ausgangsmaterial wurden vereinte Fraktionen nach der Reinigung verwendet, welche MBP-IW enthielten. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen von Faktor Xa sowie die Zugabe von 0,05 % SDS untersucht (Tabelle 8.1). Die Abbildung 8.3 zeigt die analysierten Proben mittels SDS-PAGE nach einer Inkubation von 72 h. Im Vergleich zum Leerwert (Probe ohne Faktor Xa und SDS, Bahn 3) zeigte sich lediglich ein anderes Proteinbandenmuster bei den Proben mit Zugabe von 0,05 % SDS bzw. bei einer Erhöhung auf 5 % Faktor Xa im Verhältnis zur Proteinkonzentration. Allerdings waren hier weder Proteine in Höhe des abgetrennten IW-Konstrukts bei 10 kDa zu erkennen noch eine deutliche Abnahme in Form des 42 kDa großen Proteins MBP zu sehen (Vergleich Bahn 2 als MBP-Positivkontrolle, die beiden schwarzen Pfeile zeigen die gewünschten Molekulargewichte an, in denen sich Proteine nach dem Verdau befinden sollten). Durch die Zugabe von SDS sind markante Proteinbanden bei etwa 35 kDa detektiert worden, welche besonders stark in Kombination mit 5 % Faktor Xa waren. Es zeigte sich unter diesen Bedingungen auch, dass eine Abnahme des Proteins MBP-IW (roter Pfeil) deutlich war (Bahn 7). Jedoch konnte das Protein nicht in gewünschter Weise getrennt werden (keine Proteine mit dem erwarteten Molekulargewicht, schwarze Pfeile). Trotz Zugabe von SDS und der damit verbundenen denaturierenden Wirkung (Schnittstelle für Faktor Xa somit eventuell besser zugänglich) war es nicht möglich, MBP von dem IW-Konstrukt abzutrennen. Aus diesem Grund wurde zur Isolation von IW eine direkte Hydrolyse des Proteins MBP-IW, ohne eine vorherige Trennung von MBP, vorgenommen.

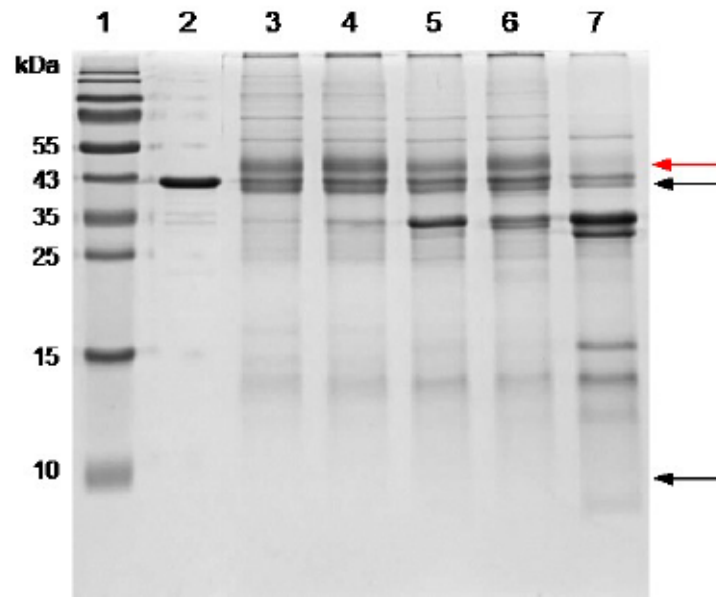


Abbildung 8.3: Elektrophoretische Auftrennung mittels 15 % SDS-Gel der Proben nach dem Verdau mit Faktor Xa für 72 h zur Trennung von MBP und dem IW-Konstrukt; Bahn 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Bahn 2: 1 µg MBP 5 Protein (Positivkontrolle), Bahn 3: Leerwert ohne Faktor Xa oder SDS, Bahn 4: Probe mit 1 % Faktor Xa, Bahn 5: Probe mit 1 % Faktor Xa + 0,05 % SDS, Bahn 6: Probe mit 5 % Faktor Xa, Bahn 7: Probe mit 5 % Faktor Xa + 0,05 % SDS; roter Pfeil markiert MBP-IW; schwarzen Pfeile markieren die gewünschten Molekulargewichte, in denen sich Proteine nach dem Verdau befinden sollten

8.2.2 Proteinreinigung von MBP-IW aus *K. lactis* - Parameterprüfung

Zusätzlich zur Reinigung des Zielproteins MBP-IW aus dem Überstand von *K. lactis* wurde eine Reinigung des Proteins MBP (vom Kontrollvektor pKLAC1-*malE* exprimiert) mittels Affinitätschromatographie durchgeführt. Die Analyse zeigte, dass das Protein MBP von den *K. lactis* Zellen, welche den linearisierten pKLAC1-*malE* Vektor integriert hatten, produziert und ins Medium ausgeschleust wurde (Abbildung 8.4). Auch hier konnte nicht das gesamte Protein an die Säule gebunden werden, da auch im Durchfluss (D) Protein bei etwa 42 kDa detektiert wurde. In den einzelnen Elutionsfraktionen konnte das Protein MBP jedoch ebenfalls nachgewiesen werden (F1-F6, Pfeil). Vor allem wurde hier ein sauberes und konzentrierteres Protein eluiert. Demnach war es möglich, unter den gleichen Bedingungen wie bei der Reinigung von MBP-IW aus *K. lactis*, das Protein MBP an die Säule zu binden und auch in reiner Form zu eluieren. Demzufolge schien es bei der Reinigung von MBP-IW ein generelles Problem mit dem produzierten Zielprotein aus *K. lactis* zu geben.

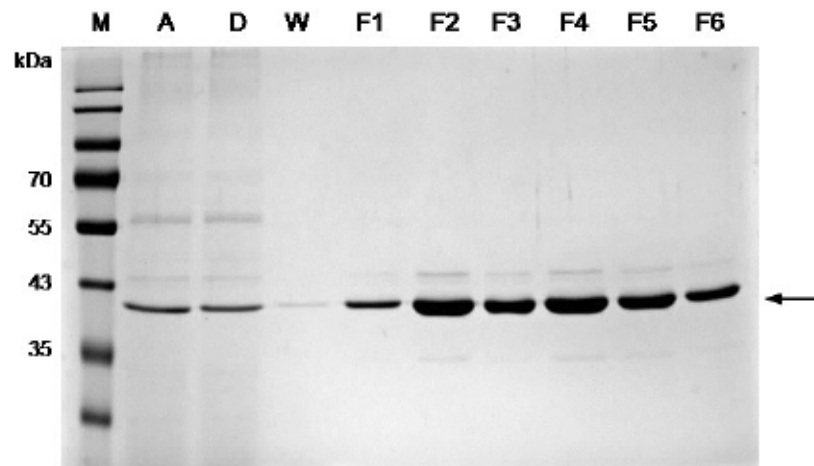


Abbildung 8.4: Elektrophoretische Auftrennung mittels 12 % SDS-Gel der Proben vom Reinigungsschritt (Affinitätschromatographie) des Kontrollproteins MBP; M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, A: Auftrag, D: Durchfluss, W: Waschschrift, F1-F6: Fraktion 1-6; Pfeil markiert MBP

Durch das Problem bei der Reinigung von MBP-IW und vor dem Hintergrund einer generellen Schwierigkeit, die korrekte Proteinbande dem Zielprotein anhand des SDS-Gels zuzuordnen, wurden noch weitere Proben analysiert. Es wurden hierfür Überstände der Kulturen von den GG799 *K. lactis* Zellen und den in *K. lactis* integrierten Vektoren pKLAC2 (ohne Insert), pKLAC1-*malE* (als Kontrolle) im Vergleich zum Klon pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8 getestet. Alle Überstände zeigten zwischen 43 kDa und 55 kDa das gleiche Proteinbandenmuster der markanten Banden (in unterschiedlicher Stärke). Da selbst die Proteinexpression der GG799 *K. lactis* Zellen diese Banden zeigten, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um Hefe-eigene Proteine handelt, welche während der Fermentation ins Medium ausgeschleust werden (Abbildung 8.5 A, Bahn 2). Beim Klon pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8 scheinen noch Proteine im Bereich zwischen diesen markanten Banden exprimiert zu sein (Bahn 5, Pfeile), welche eventuell das Protein MBP-IW sein könnten. Anhand des Western Blots ist auch eindeutig detektiert worden, dass es sich bei den markanten Proteinbanden nicht um die gewünschten Proteine handelte, da in den Überständen der GG799 Zellen und des leeren pKLAC2 Vektors, welcher in das Hefegenom integriert wurde, keinerlei MBP exprimiert wurde (Abbildung 8.5 B, Bahn 2-3). Der Kontrollvektor pKLAC1-*malE*, welcher linearisiert und in das *K. lactis*-Genom integriert wurde, exprimiert MBP (Bahn 4). Hier ist jedoch, anders als im SDS-Gel, eine Doppelbande mit dem Ak gegen MBP detektiert worden. Auch Proteine, welche vom integrierten pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8 exprimiert wurden, konnten mit dem Ak gegen MBP detektiert werden. Es wurde demnach MBP-IW produziert, jedoch in einer deutlich

geringeren Menge als MBP vom Kontrollvektor. Dies war wahrscheinlich der Grund für eine schlechte Ausbeute bei der Proteinreinigung, da das Protein nicht ausreichend produziert wurde.

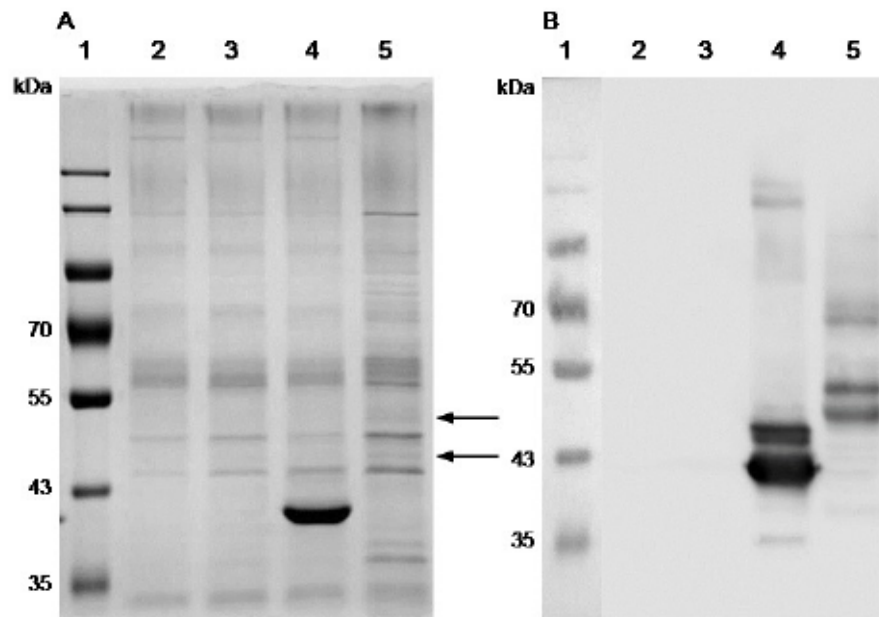


Abbildung 8.5: Elektrophoretische Auftrennung mittels A) 10 % SDS-Gel und B) Western Blot der konzentrierten Proben nach 48 h Wachstum; A-B) Bahn 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Bahn 2: GG799 *K. lactis* Zellen, Bahn 3: leerer pKLAC2 Vektor, Bahn 4: pKLAC1-*malE* Vektor als Kontrolle mit Produktion von MBP, Bahn 5: pKLAC2-MBPIW K10 Klon 8; Pfeile markieren Banden, welche MBP-IW sein könnten

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Andreas Deußen für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und dafür, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Für die Möglichkeit meine Daten zu veröffentlichen und zu präsentieren sowie für die fachliche und freundliche Betreuung bin ich sehr dankbar.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Georg Breier, Leiter des Bereichs Biologie für Mediziner an der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden, für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Promotion.

Ein ganz besonderer Dank gilt Melanie Martin für die hervorragende Betreuung, die große Hilfe beim Publizieren meiner Daten sowie für die wissenschaftlichen Diskussionen. Danke, dass du immer in allem das Positive gesehen hast und mich dazu motiviert hast selbst kleine Dinge als Erfolge zu schätzen.

Mein weiterer Dank gilt Peter Dieterich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

Weitehrhin möchte ich mich bei Frauke Härtel für ihr stets offenes Ohr sowie für die Hilfe bei den letzten Korrekturen meiner Arbeit bedanken. Außerdem danke ich Karolina Ihle für die Hilfe bei der Klonierung und die gute Zusammenarbeit beim Praktikum.

Ein großer Dank geht an Corina Oswald für die angenehme und lustige Büroatmosphäre. Danke für dein geduldiges Zuhören bei kleineren und größeren Problemen.

Ein spezieller Dank gilt dem gesamten Team des Instituts für die tolle Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft untereinander. Danke auch dafür, dass ich sofort herzlich in die Frühstücksrunde aufgenommen wurde. Mein besonderer Dank gilt Birgit Zatschler für die Präparation der Aortenringe, Antje Messer für die Einarbeitung in die Zellkultur und Carmen Friebe für die Isolierung der thorakalen Rattenaorta sowie die angebotene Hilfe, wenn es mal hektisch wurde.

Ein großer Dank gilt der Arbeitsgruppe im Bereich des Instituts für Physiologische Chemie an der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Krieger, dafür, dass ich meine Experimente zur Proteinreinigung in Ihren Laboren durchführen konnte. Danke für die freundliche Unterstützung von Karina Kettner und Claudia Bodenstein.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Henning Morawietz, Leiter der Arbeitsgruppe Gefäßendothel und Mikrozirkulation an der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden, dass ich einige Experimente in Ihrem Labor durchführen konnte. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, dass durch Ihre Anfertigung von Gutachten eine Finanzierungsmöglichkeit in der Abschlussphase meiner Arbeit möglich war. Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Melanie Brux für die Hilfe am Anfang meiner Klonierungsarbeiten.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Henle, Leiter des Instituts für Lebensmittelchemie der TU Dresden, für die Zusammenarbeit während der Studien zu den ACE-hemmenden Peptiden bedanken. Danke auch an Steffi Rudolph für die Identifikation und Quantifizierung der ACE-hemmenden Peptide in den hydrolysierten Proteinen und an Diana Hagemann für die MS-Messung des rekombinant produzierten IW.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Von ganzem Herzen danke ich dir, Patrick, für dein entgegengebrachtes Verständnis, deine Geduld sowie für deine liebevolle Unterstützung und deine aufbauenden Worte, wann immer diese nötig waren.

Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.
2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Prof. Dr. med. Andreas Deußen, Frau Dr. rer. nat. Melanie Martin, Frau Dr. rer. physiol. Frauke Härtel, Herr Dr. rer. nat. Peter Dieterich
3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.
5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgender Form veröffentlicht:

Publikationen:

Michelke L, Deussen A, Dieterich P, Martin M. 2017. Effects of bioactive peptides encrypted in whey- , soy- and rice protein on local and systemic angiotensin-converting enzyme activity. J Funct Foods 28:299–305. doi:10.1016/j.jff.2016.11.026

Michelke L, Deussen A, Kettner K, Dieterich P, Hagemann D, Kriegel TM, Martin M. 2018. Biotechnological production of the angiotensin-converting enzyme inhibitory dipeptide isoleucine-tryptophan. Eng. Life Sci. doi:10.1002/elsc.201700172

Tagungsbeiträge:

5th Student Retreat, International PhD Program: Homeostatic and regulatory functions of endothelium. Dresden, 28-29.11.2014 (Posterpräsentation)

Michelke L, Martin M, Deussen A.

ACE-inhibiting effect of isoleucine-tryptophan-containing hydrolysates and production of this peptide in prevention of hypertension.

94. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft. Magdeburg, 05-07.03.2015 (Posterpräsentation)

Michelke L, Martin M, Deussen A.

ACE-inhibiting potential of isoleucine-tryptophan obtained by food hydrolysis and its production by a biotechnical approach. P 212

6th Student Retreat, International PhD Program: Homeostatic and regulatory functions of endothelium. Dresden, 06-07.11.2015 (Posterpräsentation)

Michelke L, Martin M, Deussen A.

ACE-inhibiting effect of isoleucine-tryptophan-containing hydrolysates in prevention of hypertension.

95. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft. Lübeck, 03-05.03.2016 (Posterpräsentation)

Michelke L, Martin M, Deussen A.

Production of ACE-inhibiting dipeptide isoleucine-tryptophan and its role in prevention of hypertension. P 11-04

34th European Peptide Symposium. Leipzig, 04-09.09.2016 (Posterpräsentation)

Michelke L, Martin M, Deussen A.

Production of ACE-inhibiting dipeptide isoleucine-tryptophan and its role in prevention of hypertension. PP IX-276

40. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention. Berlin, 01-03.12.2016 (Posterpräsentation)

Michelke L, Martin M, Dieterich P, Deussen A.

Effekte von bioaktiven Peptiden aus Molke-, Soja- und Reisprotein auf die lokale und systemische Angiotensin-Converting Enzymaktivität. P 55

7th Student Retreat, International PhD Program: Homeostatic and regulatory functions of endothelium. Dresden, 20.01.2017 und 10.02.2017 (Vortrag)

Michelke L, Martin M, Deussen A.

Production of ACE-inhibiting dipeptide isoleucine-tryptophan.

6. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.
7. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.
8. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.

Dresden, 14.02.2018

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation

das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen

Aktenzeichen der zuständigen Ethikkommission

EK 299082014 und EK 203112005

die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes

Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde zum Vorhaben/zur Mitwirkung

AZ. 24-9168.24-1/2012-16

die Einhaltung des Gentechnikgesetzes

Projektnummer

Sicherheitsstufe 2: AZ. 55-8811.72/46

die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Dresden, 14.02.2018